

CÁTIA REGINA SILVA

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE HEMÓCITOS
MICRONUCLEADOS, INDUZIDOS PELO ÁCIDO
OCADÁICO, EM MEXILHÕES *Perna perna*
(MOLLUSCA : BIVALVIA).**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientador : Dr. William Gerson Matias

Florianópolis
2000

“ESTUDO DA FREQUÊNCIA DE HEMÓCITOS MICRONUCLEADOS, INDUZIDOS PELO ÁCIDO OCADÁICO, EM MEXILHÕES”.

CÁTIA REGINA SILVA

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós - Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

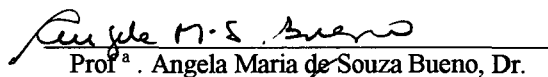
MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL

na Área de Tecnologias de Saneamento Ambiental

Aprovado por:



Prof. Flávio Rubens Lapolli, Dr.
(Coordenador)



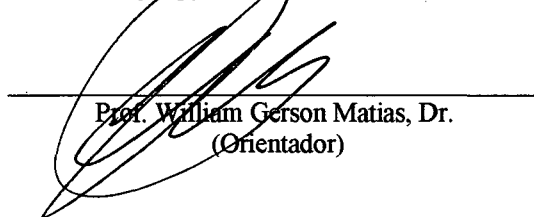
Prof.^a. Angela Maria de Souza Bueno, Dr.



Prof. Paulo Belli Filho, Dr.



Prof. Guilherme Farias Cunha



Prof. William Gerson Matias, Dr.
(Orientador)

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL
ABRIL/2000

Dedico este Trabalho:

**Ao Carlos pelo carinho,
paciência e sobretudo seu
amor.**

**À minha mãe pela
presença sempre
constante.**

**Ao meu pai (*in memoriam*)
por seu exemplo de vida.**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. William Gerson Matias pela orientação, dedicação, confiança e amizade demonstrada durante esses anos de convívio.

Ao Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina na pessoa de seu coordenador Prof. Jaime Fernando Ferreira por ter cedido os mexilhões para este estudo.

Ao Departamento de Oceanografia da Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI na pessoa do professor Dr. Luiz Proença por ter cedido gentilmente a cepa do dinoflagelado utilizada neste trabalho.

Ao Professor Creppy da Université de Bordeaux por ter cedido o ácido ocadáico.

Ao Professor Mário Steindel por sua ajuda sempre que solicitada e por ter cedido a ciclofosfamida.

Ao Professor Jaime F. Ferreira por sua imprescindível ajuda na execução deste trabalho.

Às Professoras Angela Bueno e Jeanete Agostini por terem dado início a tudo isto e por sempre estimularem e acreditarem em mim.

Aos grandes e sempre amigos Dani, Jorge e Marcos por tantos risos e palhaçadas que ajudam a relaxar.

À Marcia pelos bons momentos passados ao longo desses anos e por sua preciosa ajuda em todas as etapas deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório Toxicologia: Ivana, Alexandre e Ricardo pelo agradável convívio.

Ao Nico por sua arte em fotografar e proporcionar essas maravilhosas fotos mostradas neste trabalho.

Ao Laboratório Integrado do Meio Ambiente - LIMA na pessoa de seu Coordenador Prof. Mauricio Sens pelo apoio.

Ao corpo técnico do LIMA, Marcio, Américo, Carlos e Nico por terem suportado a tantos pedidos e sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos novos e bons amigos Kelly, Maria Elisa, Mariana, Clarissa, Marilda, Delmira, Lu, Anelisse, João, Baiana, Alexandre pelos bons momentos durante este tempo.

Aos velhos e sempre amigos Denize, Gisele, Chenel, Clau, Karla, Paulinho, Elton, Edmundo e Maurício pelo incentivo.

Aos Professores e Funcionários do Curso de Pós Graduação em Engenharia Ambiental que, de uma forma ou de outra, contribuíram para elaboração deste trabalho.

Aos meus irmãos e sobrinhos pela força e carinho.

À Cissa por suas incansáveis horas deitada ao meu lado no computador.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior - CAPES pela bolsa de mestrado.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

LISTA DAS TABELAS	ix
LISTA DAS FIGURAS	xi
LISTA DAS ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUÇÃO	1
II. OBJETIVOS	6
II. 1. Objetivo Geral	6
II. 2. Objetivos Específicos	6
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
III. 1. Florações de Algas	7
III. 1.1. A Problemática das Florações de Algas	7
III. 1.2. As prováveis causas das Florações de Algas	8
III.1.3. Os Efeitos das Florações de Algas Tóxicas	10
III.1.4. Os Dinoflagelados	13
III.1.4.1. Dinoflagelado da Espécie <i>Prorocentrum lima</i>	14

III.1.5. O Ácido Ocadáico	16
III.1.5.1. Propriedades físico-químicas do Ácido Ocadáico	16
III.1.5.2. Aspectos Ecoepidemiológicos dos Efeitos do Ácido Ocadáico	17
III. 1.5.3. Efeitos Tóxico, Genotóxico e Tumorigênico do Ácido Ocadáico	20
III.2. Mexilhões na Ecotoxicologia	23
III. 2.1. Cultivo	23
III.2.2. Aspectos da Biologia do <i>Perna perna</i>	25
III. 3. Genotoxicidade Ambiental	27
III. 3. 1. Métodos de Avaliação de Genotoxicidade Ambiental	29
III. 3.1.1. Micronúcleos	30
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	35
IV.1. Materiais Biológicos	35
IV.1.1. <i>Perna perna</i>	35
IV. 1.2. <i>Prorocentrum lima</i>	35
IV. 1.3. <i>Mus musculus</i>	37
IV. 2. Métodos	37
IV. 2.1. Coleta de <i>Perna perna</i>	37
IV. 2.2. Cultivo de <i>Prorocentrum lima</i>	39
IV. 3. Experimentos	41

IV. 3.1. Exposição dos Mexilhões ao Ácido Ocadáico Puro	41
IV.3.2. Experimento dos Mexilhões Alimentados com <i>Prorocentrum lima</i>	43
IV.3.2.1. Preparação das Soluções de <i>Prorocentrum lima</i>	43
IV.3.2.2. Exposição dos Mexilhões	43
IV.3.3. Mexilhões Expostos a Ciclofosfamida	46
IV. 3.4. Preparações Citológicas	47
IV.3.4.1. Obtenção da Hemolinfa	47
IV. 3.4.2. Coloração	48
IV.3.4.3. Análise Citogenética	48
IV.3.5. Bioensaio com Camundongos	50
IV. 4. Análises das Águas utilizadas nos Experimentos	51
IV.4.1. Parâmetros Físico-Químicos e Biológicos	51
IV.4.2. Coleta e Manutenção das Águas	51
IV. 5. Análise Estatística	52
V. RESULTADOS	53
V.1.Freqüência de Hemócitos Micronucleados em Mexilhões Expostos ao Ácido Ocadáico Puro	53
V.1.1. Morfologia Nuclear	58
V.1.2. Resultados das Análises dos Parâmetros Físico-Químicos	59
V.2. Freqüência de Hemócitos Micronucleados em Mexilhões	

Alimentados com Diferentes Concentrações de <i>Prorocentrum lima</i>	63
V.2.1. Morfologia Nuclear	69
V.2.2. Resultados das Análises dos Parâmetros Físico-Químicos	69
V.3. Resultado do Experimento com Ciclofosfamida	73
V.4. Bioensaio com Camundongos	73
V.5. Resultados das Análises Físico-Químicas e Biológicas das Águas dos Locais de coleta, Manutenção e Testes dos Mexilhões	73
VI. DISCUSSÃO	77
VII. CONCLUSÕES	93
ANEXOS	94
GLOSSÁRIO	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Resultados das comparações estatísticas das frequências de hemócitos micronucleados entre os diferentes grupos	56
TABELA 2. Resultados das comparações estatísticas das frequências de hemócitos micronucleados, entre o grupo exposto ao ácido ocadáico e os grupos controles, nos diferentes períodos de exposição	58
TABELA 3. Média, desvio padrão e valores máximos e mínimos dos diâmetros dos núcleos e micronúcleos encontrados nas análises citológicas realizadas pelo analizador de imagem "Image Pro Plus".	61
TABELA 4. Média e desvio padrão dos valores de pH, OD e temperatura da água obtidos nos aquários controles.	61
TABELA 5. Média e desvio padrão dos valores de pH, OD e temperatura da água obtidos nos aquários contendo o ácido ocadáico.	62
TABELA 6. Resultados das comparações estatísticas das frequências de hemócitos micronucleados entre os grupos de mexilhões alimentados com <i>Prorocentrum lima</i> e o grupo controle	64

TABELA 7. Resultados das comparações estatísticas das frequências de hemócitos micronucleados, entre os grupos alimentados com diferentes concentrações de <i>Prorocentrum lima</i> e o grupo controle, nos diferentes períodos de exposição.	68
TABELA 8. Média, desvio padrão e valores máximos e mínimos dos diâmetros dos micronúcleos e núcleos encontrados nas análises citológicas no experimento de alimentação dos mexilhões com <i>Prorocentrum lima</i> .	70
TABELA 9. Média e desvio padrão dos valores de pH, OD e temperatura da água obtidos durante a alimentação dos mexilhões com <i>Prorocentrum lima</i> e nos aquários controles.	70
TABELA 10. Total de células inteiras e carapaças vazias de <i>Prorocentrum lima</i> encontradas nas fezes dos mexilhões.	71
TABELA 11. Número total de hemócitos micronucleados nos mexilhões expostos a ciclofosfamida.	75
TABELA 12. Resultados das análises dos parâmetros físico-químicos e biológicos das águas	76

LISTA DAS FIGURAS

FIGURA 1 . Aspecto de uma Maré Vermelha.	12
FIGURA 2. Fórmula Estrutural do Ácido Ocadáico.	16
FIGURA 3. Exemplares de <i>Perna perna</i> .	36
FIGURA 4. Exemplares de <i>Prorocentrum lima</i> .	36
FIGURA 5. Ilha de Ratores Grande onde procedeu-se as coletas.	40
FIGURA 6. Frasco fermentador contendo o cultivo de <i>Prorocentrum lima</i> .	40
FIGURA 7. Aspecto geral do experimento com ácido ocadáico puro.	42
FIGURA 8. Aspecto geral do experimento com alimentação de <i>Prorocentrum lima</i> .	45
FIGURA 9. Músculo adutor posterior.	49
FIGURA 10. Características dos hemócitos normais (a) e dos hemócitos micronucleados (b) observados em microscopia óptica, após coloração através do método Feulgen-Fast-Green.	54
FIGURA 11. Distribuição do número total de hemócitos micronucleados no grupo exposto ao ácido ocadáico e nos dois grupos controles (Solvente e Água do Mar) .	55
FIGURA 12. Distribuição do número total de hemócitos micronucleados, nos três grupos experimentais, em períodos de 24, 48 e 72 horas.	57
FIGURA 13. Anomalias nucleares encontradas nas análises citológicas realizadas pelo analizador de imagem -"Image Pro Plus": a) micronúcleo grande, b) micronúcleo aderido ao núcleo e c) micronúcleo em ponte.	60

- FIGURA 14.** Distribuição do número total de hemócitos micronucleados nos grupos de mexilhões alimentados com diferentes concentrações de *Prorocentrum lima* e no grupo controle. 65
- FIGURA 15.** Distribuição do número total de hemócitos micronucleados, em diferentes períodos de exposição (24 e 48 horas), nos grupos de mexilhões alimentados com diferentes concentrações de *Prorocentrum lima* e no grupo controle. 67
- FIGURA 16.** Aspecto das fezes dos mexilhões alimentados com *Prorocentrum lima*. 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AO - Ácido Ocadáico

DSP - Síndrome do Envenenamento Diarreico

HCL – Ácido Clorídrico

HMN – Hemócitos Micronucleados

LCMM - Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos

LIMA - Laboratório Integrado do Meio Ambiente

MN - Micronúcleos

OD - Oxigênio Dissolvido

pH - Potencial Hidrogeniônico

UV - Ultra Violeta

RESUMO

Algumas toxinas presentes naturalmente no ambiente marinho são capazes de induzir mutagenicidade e/ou carcinogenicidade. Entre essas toxinas, o ácido ocadáico (AO) vem despertando considerável interesse por ser genotóxico em baixas concentrações e por acumular-se em animais filtradores marinhos, inclusive naqueles utilizados na alimentação humana, representando assim um problema ambiental e de saúde pública. O principal objetivo desse trabalho foi avaliar a genotoxicidade do ácido ocadáico, através do estudo da frequência de hemócitos micronucleados em mexilhões *Perna perna*. Este trabalho teve ainda como objetivos: a) verificar se a concentração de *Prorocentrum lima* ingerida pelos mexilhões interfere na genotoxicidade (de modo a ser detectada através da frequência de hemócitos micronucleados); b) verificar, através do bioensaio com camundongos, a presença do ácido ocadáico nos hepatopâncreas dos mexilhões; e) realizar análises físico-químicas das águas dos locais de coleta e das águas utilizadas nos experimentos. Para os testes com o AO puro, utilizamos uma concentração de 0,3 µg de AO diluído em 10 µl de água ultra pura e etanol; para o experimento de alimentação dos mexilhões com células de *Prorocentrum lima* utilizamos concentrações de 200 células/L, 1000 células/L e 10000 células/L por animal. A análise estatística dos resultados das análises citológicas, realizada através do teste de Kruskal-Wallis, com um nível de significância de 5%, mostrou diferença significativamente maior

na frequência de hemócitos micronucleados no grupo exposto ao AO puro do que nos grupos controles. Também foi observada diferença significativa entre as frequências de hemócitos micronucleados dos animais alimentados com as diferentes concentrações de *P. lima* e o grupo controle. Não foi possível detectar a presença do AO nos hepatopâncreas dos mexilhões alimentados com diferentes concentrações de *Prorocentrum lima*. Os resultados das análises físico-químicas das águas mostraram que todas estão dentro dos limites estabelecidos pela resolução 20/86 do CONAMA. Os resultados permitem demonstrar que a atividade genotóxica do AO, do modo como foi aqui empregado, pode ser detectada pelo teste do micronúcleo em hemócitos de mexilhões *Perna perna*. Em vista dos resultados aqui obtidos pode-se recomendar que este organismo e este teste sejam utilizados para a detecção precoce desta toxina no ambiente marinho, principalmente em locais de cultivo de mexilhões.

ABSTRACT

Some toxins present naturally in the marine environment are capable of inducing mutagenesis or carcinogenesis. Among these toxins, okadaic acid (OA) is gaining considerable interest since it is genotoxic in low concentrations and because it accumulates in marine filtering animals, including those used for human consumption, therefore representing an environmental and public health problem. The main objective of this study was to evaluate the genotoxicity of okadaic acid, in the haemocytes of the mussel *Perna Perna*, used micronucleus tests. This study also had as objectives: a) to verify the concentration of *Prorocentrum lima* consumed by the mussel which interferes with the genotoxicity, the mode of detection being through the frequency of micronuclei of haemocytes b) to verify through tests with mice, the presence of okadaic acid in the hepatopancreas of mussels and c) to carry out physico-chemical analysis of waters from the collection points and of the water used in the experiments. For the tests with pure okadaic acid, we used a concentration of 0.3µg diluted with 10µl of ultra pure water and ethanol and for the experiment with the food *P. lima* we used concentrations of 200 cells/L, 1000 cells/L and 10.000 cells/L for each animal. The statistical analysis of the results obtained in the cytological analysis was carried out through the Kruskal-Wallis test, with a significance level of 5%, which showed a significantly higher frequency of micronuclei in haemocytes from group exposed to pure okadaic acid and the control groups. A significant

difference was also observed between the frequency of micronuclei of haemocytes in animals fed with differing concentrations of *P. lima* and the control group. It was not possible to detect the presence of okadaic acid in the hepatopancreas of the mussels fed with different concentrations of *P. lima*. The results of the physico-chemical and biological analysis of the waters showed that they were all within the limits established by resolution 20/86 of CONAMA. We concluded therefore, that the genotoxic activity of okadaic acid, even in low concentrations, can be detected by the micronucleus testing of haemocytes of the mussel *P. Perma*. From the results obtained here, it can be recommended that this organism and this test be utilised for the early detection of this toxin in the marine environment, principally in areas where mussels are cultivated.

I. INTRODUÇÃO

A maior parte da riqueza dos oceanos está presente nas plataformas continentais e áreas costeiras, principalmente nos estuários e nas áreas de ressurgência. A zona costeira apresenta uma grande variedade de ecossistemas com grande importância ambiental pois estes ecossistemas são extremamente produtivos e ao mesmo tempo, apresentam grande sensibilidade e susceptibilidade à degradação antrópica (TOMMASI, 1998).

A manutenção de uma determinada comunidade em um ecossistema depende da interação de fatores físicos, químicos e bióticos. MARGALEF (1974) destacou a importância das interações químicas na diversificação dos ecossistemas e na evolução das espécies. De acordo com estes conceitos, é explicável que, em milhões de anos que precederam a formação de uma determinada comunidade, as populações desenvolveram e refinaram compostos que eventualmente se adequaram a uma comunicação química. Na evolução de uma sequência metabólica podem surgir compostos tóxicos, que podem ser tolerados por alguns organismos, mas que, por outro lado, podem ser nocivos para outros membros da comunidade. Essa tolerância pode conferir uma vantagem adaptativa ao organismo que a possui podendo vir a ser importante na perpetuação da espécie (FREITAS, 1995). O autor sugere que, provavelmente, este processo tenha ocorrido também nas comunidades fitoplancônicas, levando ao surgimento de espécies portadoras de potentes toxinas.

Ainda não está claro porque alguns organismos produzem essas toxinas, que em geral são metabólitos secundários, ou seja, produtos naturais com papel não explícito nos organismos que os produzem. Porém, em alguns organismos, as toxinas possuem atividades específicas e a melhoria do valor adaptativo de seus portadores, pode ser relacionada com uma melhoria das suas relações bióticas e abióticas (BOTANA *et al.*, 1996).

O estudo das toxinas tem grande importância médico-sanitária, e a vigilância sanitária, para a detecção da presença de organismos potencialmente tóxicos, especialmente os que compõem o plâncton das águas em que são criados organismos filtradores utilizados para a alimentação humana, é importante tanto para a saúde humana como para a preservação da biota local (MARGALEF, 1974).

Mexilhões, ostras, vieiras e outros moluscos bivalves, apesar de consumidos regularmente e em larga escala com bastante segurança, podem, de forma ocasional, em função do local onde vivem e da época do ano, estar envenenados. Devido ao seu hábito alimentar filtrador, a proliferação exagerada de microalgas planctônicas produtoras de toxinas, pode facilmente contaminar estes animais. Nesse processo de alimentação, as substâncias poluentes e nocivas do meio vão aos poucos sendo retidas e acumulando-se em seu organismo, sem provocar-lhes, porém, qualquer problema, pois, quase sempre são tolerantes aos seus efeitos diretos; no entanto, podem vir a ser tóxicos para os organismos que os utilizam de alimento (SUGANUMA, 1988; WRIGHT, 1989).

A primeira característica que uma proliferação excessiva de algas tóxicas pode causar é a modificação na cor das águas, o que chamamos de águas coloridas ou maré vermelha. Denominamos popularmente de “maré vermelha”, as florações tóxicas que são

causadas pela proliferação massiva de algumas espécies fitoplanctônicas, principalmente dinoflagelados, por um limitado período de tempo (LASSUS, 1989).

O fenômeno da maré vermelha ocorre em diversas áreas do globo, por fatores não totalmente conhecidos e são, em grande parte, imprevisíveis. Sabe-se que fatores como variações de temperatura e salinidade (WATRAS *et al.*, 1982), alterações na composição do plâncton e a contaminação por certos poluentes podem contribuir para a produção do fenômeno.

Devido a necessidade de um conhecimento mais detalhado dos danos causados por algas tóxicas, estão sendo desenvolvidos programas de biomonitorização, em diversos países, utilizando várias metodologias, tanto em zonas de importância turística como de aquicultura, com o propósito de prevenir as conseqüências toxicológicas à biota marinha, e também direta ou indiretamente à saúde humana (DE FLORA *et al.*, 1991).

Atualmente uma das metodologias utilizadas para avaliação de danos causados por substâncias genotóxicas nos organismos, é o teste do micronúcleo. Este tipo de teste tem sido muito recomendado para estudos de biomonitorização ambiental, principalmente pela capacidade de avaliar alterações cromossômicas determinadas por substâncias genotóxicas (LIVINGSTONE *et al.*, 1993). Muitos destes trabalhos de biomonitorização utilizam os mexilhões como bioindicadores (BURGEOT *et al.*, 1996; VERNIER *et al.*, 1997; JANERI, 1999). Esses organismos são considerados bioindicadores e sentinelas ideais, refletindo o nível de contaminação do ambiente marinho, tanto em programas de monitorização de curta como de longa duração (BAYNE, 1989). Além disso, os mexilhões tem se destacado pela sua importância

econômica como fonte de alimento, em decorrência, principalmente, do avanço das técnicas de cultivo (SEED & BROWN, 1977).

O projeto catarinense de desenvolvimento da mitilicultura, através da transferência de tecnologia de cultivo, treinamento e apoio à comercialização, apresenta um cunho social e econômico relevante. A mitilicultura está se tornando a grande alternativa econômica para o pescador e ainda possibilita sua permanência na atividade pesqueira.

A Universidade Federal de Santa Catarina, através do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM - Barra da Lagoa) do Departamento de Aquicultura - Centro de Ciências Agrárias, desenvolve, desde 1985, pesquisas e formação de recursos humanos com o objetivo de incentivar o cultivo de mexilhões. Os resultados dessas pesquisas são aplicados pelos produtores por intermédio do serviço de extensão da Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária (EPAGRI).

O controle da qualidade sanitária dos moluscos e do meio em que são cultivados, principalmente em relação às toxinas marinhas, deve garantir um produto com qualidade apropriada ao consumo humano.

O ácido ocadáico (AO) é considerado a principal toxina marinha associada com a contaminação de moluscos em diversas regiões costeiras. No Brasil, esta toxina foi detectada em moluscos do litoral sul (PROENÇA *et al.*, 1998). Os graves efeitos desta toxina tornam o consumo de mexilhões contaminados um sério problema de saúde pública. Este fato, aliado à crescente produção de moluscos no Estado de Santa Catarina faz com que seja necessário um estudo para avaliação de sua genotoxicidade para os mexilhões da espécie *Perna perna* (LINNAEUS, 1758). Além disso, essas exposições da

fauna aquática à genotoxinas, num contexto ecológico, podem levar à mutações herdáveis e perda na diversidade genética, com significantes implicações para sobrevivência das populações expostas a longo prazo. Portanto, este tipo de estudo, além de auxiliar a avaliar a qualidade do cultivo destes organismos, reveste-se de considerável importância no sentido de avaliar o dano causado pela genotoxina na espécie em questão e, conseqüentemente, na manutenção da diversidade marinha..

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo Geral:

Avaliar a ocorrência de efeito genotóxico, a nível cromossômico, evidenciado sob a forma de micronúcleos, do ácido ocadáico em hemócitos de mexilhões *Perna perna*.

II.2. Objetivos Específicos:

- 1- Quantificar as frequências de hemócitos micronucleados a partir da exposição dos mexilhões ao ácido ocadáico puro por diferentes períodos de exposição.
- 2- Determinar a concentração de *Prorocentrum lima* que ingerida por mexilhões *Perna perna*, pode alterar a frequência de hemócitos micronucleados.
- 3- Testar a presença do ácido ocadáico nos hepatopâncreas dos mexilhões alimentados com *Prorocentrum lima* através do Bioensaio com Camundongos.
- 4- Determinar as características da água do ponto de coleta dos mexilhões e da água utilizada nos experimentos no laboratório (manutenção), através de análises dos parâmetros físico-químico e biológico.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III. 1. Florações de Algas

III. 1.1. A Problemática das Florações de Algas

As microalgas do plâncton ou fitoplâncton são responsáveis por mais de 90% da síntese de matéria orgânica nos oceanos e contribuem com aproximadamente 95% da renovação anual do oxigênio atmosférico. Além disso, representam a base da teia alimentar dos ecossistemas marinhos, servindo de alimento para os organismos do zooplâncton (SUNDSTROM, *et al.*, 1990).

O fitoplâncton é composto por organismos fotossintéticos, que dependem fundamentalmente da disponibilidade de luz e nutrientes dissolvidos na água, tais como nitrogênio, fósforo, enxofre, etc., e constitui uma comunidade marinha com grande diversidade, composto por centenas de gêneros e milhares de espécies de algas unicelulares (HERNANDEZ-BECERRIL, 1987).

Em certas condições climatológicas e ambientais, algumas espécies de microalgas podem produzir compostos altamente tóxicos, conhecidos como biotoxinas marinhas. Alguns destes compostos ficam retidos no fitoplâncton, podendo assim serem assimilados pela cadeia trófica e, conseqüentemente, acumularem-se em certos organismos (LASSUS *et al.*, 1991).

O crescimento excessivo e a acumulação de microalgas portadoras de toxinas podem levar ao aparecimento das florações ou florações de algas tóxicas. O fenômeno das florações de algas é caracterizado por uma massiva proliferação ou florações periódicas e inexplicáveis de algas produtoras de toxinas, que ocorrem ocasionalmente

quando circunstâncias ambientais favorecem a reprodução dessas algas em regime exponencial (AUBERT, 1990; ANDERSON, 1994).

O aparecimento das florações de algas marinhas tóxicas ocorre em todas as partes de mundo, e tem sido relacionado com um desequilíbrio ecológico como consequência da poluição nos oceanos. Nos últimos anos este fenômeno vem gerando grandes problemas ambientais e de saúde pública, com importantes repercussões econômicas ligadas a interdição da venda de produtos contaminados (LASSUS *et al.*, 1991).

No sentido de minimizar os danos causados por algas tóxicas estão sendo desenvolvidos, em diversos países, programas de monitorização de algas nocivas e toxinas em zonas de importância turística e de aquicultura, com o propósito de detectar a época de maior incidência das florações e a espécie de microorganismo responsável (CORTÉS-ALTAMIRO *et al.*, 1995).

III. 1.2. As prováveis causas das Florações de Algas

O aparecimento das florações de algas se deve principalmente à fatores químicos, físicos, hidrológicos e climáticos, que favorecem a multiplicação e a concentração de organismos planctônicos (BERTHOME *et al.*, 1985; LASSUS, 1989).

As florações de algas aparecem após um período prolongado de altas temperaturas, tanto do ar como da água, que coincide com a ausência de agitação da massa de água. Este período não corresponde necessariamente ao período mais quente do ano, porém, à um período de aumento regular mais rápido da temperatura das águas (LASSUS, 1989).

Segundo HALLEGRAEF (1993) existem quatro explicações para o aumento dos registros da ocorrência das florações de algas tóxicas a nível mundial: 1) aumento do conhecimento científico das espécies tóxicas, 2) aumento da utilização de águas costeiras para aquicultura, 3) estimulação da floração de plâncton por eutrofização antropogênica ou por condições climáticas extraordinárias e 4) por transporte de cistos de resistência, levados por água de lastro de embarcações, associados com as translações de mexilhões de uma área para outra.

Sabe-se também que fatores como, diminuição da salinidade devido a uma forte pluviosidade (WATRAS *et al.*, 1982), ressurgências e pouca circulação de água que aumentam a eutrofização local (SWEENEY, 1976), estratificação prolongada das águas (tempo calmo, aquecimento da camada superficial) (LASSUS, 1989), diminuição da disponibilidade de nitrogênio e fósforo no meio (AUBERT, 1987; BELIN *et al.*, 1989) e ainda alterações na composição do plâncton e a contaminação por certos poluentes podem contribuir para a produção do fenômeno.

No entanto, alguns autores acreditam que existam ainda outros fatores que auxiliam no aparecimento do fenômeno. AUBERT (1990) mostrou que o ciclo de aparecimento e de proliferação dos principais grupos de fitoplâncton, diatomáceas e dinoflagelados, estão relacionados à ação de substâncias mediadoras que estimulam ou inibem as proliferações de algas.

LASSUS (1989) relata que os dinoflagelados necessitam de substâncias orgânicas e isso explicaria a localização freqüente das florações de algas próximas a desembocaduras de grandes rios, nos portos e em lugares visivelmente poluídos.

No entanto, BRICELJ *et al.* (1993) e LAABIR & GENTIEN (1999) acreditam que a recorrência e duração dos fenômenos das florações de algas se deve, também, à constante filtração de água pelos moluscos, fazendo com que essas algas tóxicas, sejam transferidas, juntamente com os biodepósitos (fezes e pseudofezes), da coluna de água para o fundo do mar.

III.1.3. Os Efeitos das Florações de Algas Tóxicas

Em um primeiro momento, uma proliferação de algas tóxicas pode causar uma modificação na cor das águas, o que chamamos de águas coloridas ou maré vermelha (Figura 1). O termo “águas coloridas” se aplica exclusivamente para as proliferações em zona costeira de organismos fitoplanctônicos que pertencem, em geral, ao grupo dos dinoflagelados (LASSUS, 1989).

O fitoplâncton pode se multiplicar rapidamente e crescer excessivamente em número e em pouco tempo, pode somar vários milhares por litro. Certos dinoflagelados vermelhos, como *Mesodinium rubrum*, tornarão a água vermelha, daí o nome maré vermelha. Porém, a água pode adquirir uma tonalidade esbranquiçada, se o organismo for a cianobactéria *Trichodesmium*, ou amarronzada como no caso da acumulação de diatomáceas na zona de arrebentação de certas praias (REGUERA *et al.*, 1997).

O massivo crescimento de algas pode ocasionar uma absorção excessiva de nutrientes da água, principalmente o oxigênio dissolvido, podendo causar a morte da fauna e flora ali existentes (FREITAS, 1995). Além disso, essas toxinas podem causar ainda alterações na estrutura trófica marinha, através de efeitos adversos em larvas e

outros estágios de desenvolvimento de organismos componentes deste sistema (LASSUS, 1991).

Devido ao crescimento excessivo de algas, as águas se tornam impróprias para recreação, abastecimento à população e ainda para criadouros de organismos filtradores utilizados para a alimentação humana (BERTHOME *et al.*, 1985). A ocorrência de algas tóxicas em cultivos de moluscos é portanto um risco à saúde pública e causa danos à economia (LASSUS, 1991).

As florações de algas tóxicas são comuns em locais de cultivo de mexilhões e estes se tornam vetores de enfermidades causadas por várias formas de envenenamentos de moluscos (STEIDINGER, 1993). Os moluscos, mexilhões em particular, acumulam em seus hepatopâncreas os organismos planctônicos e suas toxinas, que o consumidor ingere ao se alimentar. (BAYNE, 1976). Essas toxinas, estão compostas por diversas classes de biomoléculas. Dependendo do tipo de molécula gerado na via metabólica, ou sintomas diagnosticados em pessoas intoxicadas após o consumo de frutos do mar contaminados, as toxinas de algas estão agrupadas em 4 grupos: veneno paralisante de mariscos (PSP - paralytic shellfish poisoning), veneno amnésico de mariscos (ASP - amnesic shellfish poisoning), veneno neurotóxico de mariscos (NSP - neurotoxic shellfish poisoning) e veneno diarreico de mariscos (DSP - diarrhetic shellfish poisoning) (SCHANTZ *et al.*, 1975; TACHIBANA *et al.*, 1981; YASUMOTO *et al.*, 1985; SUGANUMA *et al.*, 1988; WRIGHT *et al.*, 1989).

A contaminação de moluscos e outros frutos do mar por toxinas produzidas por microalgas é um problema que assola diferentes regiões do globo como Europa, Estados Unidos, Ásia e América do Sul (LASSUS, 1989; BONI *et al.*, 1990; CHEN *et al.*, 1993;

CARMODY *et al.*, 1996). Muitos especialistas acreditam que as florações se tornam cada vez mais graves e freqüentes, pois o número de casos de intoxicações, os danos ambientais causados, as espécies tóxicas, os tipos de toxinas e ainda, o número de produtos contaminados aparentemente aumentaram (ANDERSON, 1994).



FIGURA 1. Aspecto de uma Maré Vermelha.

III.1.4. Os Dinoflagelados

Os dinoflagelados são organismos unicelulares, microscópicos, de tamanho variável (30 a 100 μ m) e vivem em diversos tipos de habitats. Cerca da metade dos dinoflagelados existentes são fotossintéticos, produzem clorofilas e pigmentos acessórios, o que implica que são organismos autotróficos ou auxotróficos (STEIDINGER, 1983). Devido a suas características biológicas a sua caracterização taxonômica é controversa, alguns autores classificam esses organismos desde verdadeiramente vegetais a protozoários.

Seus habitats, ciclo de vida e registros fósseis refletem anos de sucessivas adaptações às alterações ambientais. Acredita-se que existam 2000 espécies de dinoflagelados vivos; cerca de 30 espécies produzem toxinas que podem causar doenças no homem, mortes de peixes e outros organismos marinhos, seja diretamente através da exposição às toxinas ou indiretamente através da cadeia alimentar (STEIDINGER, 1993).

Os dinoflagelados tóxicos são semelhantes morfologicamente, citologicamente e fisiologicamente aos dinoflagelados não tóxicos, exceto que os primeiros produzem toxinas bioativas, que podem ser ativadas a níveis de picomolar ou nanomolar (STEIDINGER, 1993).

Esses organismos apresentam algumas características que os diferenciam das outras microalgas: 1) possuem dois flagelos diferentes em determinado estágio do ciclo de vida (STEIDINGER, 1983), 2) apresentam cromossomos condensados durante a interfase e mitose (BELIN *et al.*, 1989), 3) não possuem histonas associadas com seu DNA (STEIDINGER, 1983), 4) apresentam várias camadas celulósicas (DURAND-CLEMENT

et al., 1988) 5) apresentam organelas distintas e 6) estágios característicos do ciclo de vida (TAYLOR & SCANLAN, 1988).

São organismos haplóides (n) no estágio vegetativo e o zigoto é diplóide ($2n$) e apresentam linhagens geneticamente determinadas. O modo de reprodução dominante é assexuada: uma célula cresce divide-se em duas (fissão binária). Sexualmente eles produzem isogametas ou anisogametas que fundem-se e formam um planozigoto, que mais tarde transforma-se em um hipnozigoto. O hipnozigoto é tipicamente imóvel, com estágio bentônico de repouso obrigatório. Nem todos os dinoflagelados produzem cistos de repouso ou hipnozigotos, mas provavelmente aquelas espécies que produzem as florações em estuários e águas costeiras, apresentam tal estágio (STEIDINGER, 1993).

O estágio de imobilidade, ou cisto, é uma forma de resistência dos dinoflagelados; nesta forma, conseguem manter-se mais tempo no fundo do mar e são tolerantes a ambientes poluídos. Ainda neste estágio, alguns dinoflagelados ficam escondidos no sedimento por anos e, quando as condições ambientais favorecem o crescimento, estes cistos retornam e germinam, passando para um estágio de mobilidade capaz de assegurar a multiplicação assexuada e invadirem rapidamente o meio marinho, podendo então formar as florações de algas (SOURNIA *et al.*, 1991).

III.1.4.1. Dinoflagelado da Espécie *Prorocentrum lima*

Prorocentrum lima (EHRENBERG) DODGE, 1975 é uma espécie de dinoflagelado bentônico, fotossintético, que possui uma teca celulósica espessa e lisa. Seus dois flagelos são diferentes, um dos quais é livre e o outro, se localiza perpendicular ao eixo longitudinal da célula (DURAND-CLEMENT *et al.*, 1988). Esta espécie produz

concentrações significantes de ácido ocadáico, cerca de 0,02% do total de massa celular (AGUILERA *et al.*, 1997).

O *P. lima* é um dinoflagelado epífito, de modo que precisa ser ressuspendido na coluna de água para que os moluscos, principais organismos contaminados, possam ingeri-los e consequentemente acumular suas toxinas. Isto pode acontecer tanto pela ressuspensão do bentos como pela agitação das macroalgas que se fixam nas cordas de cultivo (LAWRENCE *et al.*, 1998).

O *P. lima* é mundialmente distribuído, tendo sido encontrado tanto nas regiões de águas frias como em águas mais quentes. Há registros para diversas localidades da Europa, América e Austrália (CARLSON & TINDALL, 1985; LASSUS, 1989; FAUST, 1991; JACKSON *et al.*, 1993). No Brasil há registros desta espécie na região sueste de São Paulo à Santa Catarina. No litoral catarinense foi encontrada em Florianópolis, na praia de Ponta das Canas (CARDOSO, 1993).

III.1.5. O Ácido Ocadáico

III.1.5.1. Propriedades físico-químicas do Ácido Ocadáico

O AO é um poliéter de ácidos graxos, com fórmula estrutural (C₄₄H₆₈O₁₃) (Figura 2) e de peso molecular 804. Se apresenta na forma de um pó cristalino de cor branca, com um ponto de fusão que se situa entre 164 a 166°C (TACHIBANA *et al.*, 1981). É estável a -20°C durante vários meses em uma solução de metanol. Sua absorção máxima em UV se situa em torno de 210 nm.

A sua DL₅₀ é de 192 µg/Kg para ratos e seu efeito tóxico agudo se apresenta em doses superiores a 120µg/Kg (TACHIBANA *et al.*, 1981), mostrando que se trata de uma substância muito tóxica.

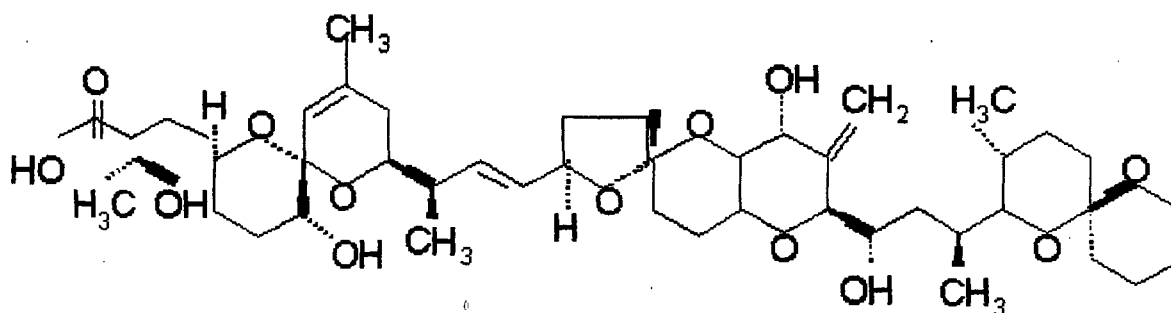


FIGURA 2. Fórmula Estrutural do Ácido Ocadáico.

III.1.5.2. Aspectos Ecoepidemiológicos dos Efeitos do Ácido Okadáico

O AO é uma toxina marinha, primeiramente isolado de esponjas negras *Holichondria okadaii* (TACHIBANA *et al.*, 1981) e posteriormente do dinoflagelado *Prorocentrum lima* (MURAKAMI *et al.*, 1982).

Diferentes aspectos da toxicidade deste ácido, vem sendo estudado de maneira intensa por diversos pesquisadores (SUGANUMA *et al.*, 1988; WRIGHT *et al.*, 1989; AONUMA *et al.*, 1991; RIEBER & RIEBER, 1992; MELLGREN *et al.*, 1993; FESSARD *et al.*, 1996; MATIAS & CREPPY, 1996b, 1998 e 1999; entre outros). O AO é a principal toxina produzida por dinoflagelados, e quando acumulada nos hepatopâncreas de mexilhões e ostras, pode causar a síndrome da diarreia "Diarrhetic shellfish poisoning" (DSP) em consumidores.

O efeito diarreico do AO tem sido atribuído à acumulação de proteínas fosforiladas que controlam a secreção de sódio nas células do intestino e também à inibição de elementos juncionais que regulam a permeabilidade dos solutos, que juntos resultam na perda passiva de fluidos (TUBARO *et al.*, 1996).

As toxinas que provocam a DSP, modificam a permeabilidade dos vasos do tubo digestivo no homem, provocando uma severa gastroenterite acompanhada de dores abdominais, usualmente os sintomas começam dentro de 3 a 5 horas, após a ingestão do mexilhão contaminado. Esta gastroenterite desaparece normalmente dentro de 3 a 4 dias. Aproximadamente 50% dos casos apresentam ainda, náusea, vômitos, cãibra e dores de cabeça. (LASSUS, 1983; FREUDENTHAL & JIJINA, 1988). Dependendo da susceptibilidade do doente, pode-se observar sintomas gerais como vertigem, febre e, em certas ocasiões, leves problemas cardíacos (LASSUS, 1983).

A DSP tem sido considerada um sério problema na Europa, Japão e na América do Norte (MARR *et al.*, 1994).

O primeiro caso relatado de DSP ocorreu na costa norte do Japão, nos verões de 1976 - 1977 (YASUMOTO *et al.*, 1978). Mais tarde, em 1981, um incidente com DSP causou cerca de 5000 casos de gastroenterite na Espanha (KUMAGAI *et al.*, 1986). Na França apareceu pela primeira vez na costa da Normandia em 1983, ocasião em que ocorreram 3300 casos de intoxicações (BELIN *et al.*, 1989). Novamente, em 1985, 400 casos de DSP foram registrados na costa mediterrânea francesa (VOLTERA *et al.*, 1990). Na Itália o primeiro caso de gastroenterite relatada por DSP ocorreu em 1989 (BONI *et al.*, 1990). Em 1993, um importante evento tóxico provocado por toxinas tipo DSP, causou grandes danos para economia na Galicia - Espanha através da interdição da venda de moluscos contaminados por 5 meses (GAGO-MARTINEZ *et al.*, 1996).

Não há relatos dessas intoxicações por DSP no Brasil/No entanto, não há razão para acreditar que os mexilhões das águas brasileiras estejam livres deste problema, pois é possível identificar muitas espécies altamente tóxicas em listas de distribuição de algas na costa brasileira (PROENÇA *et al.*, 1998). O autor acredita que a ausência de casos relatados de intoxicação humana no Brasil seja devido a falta de conhecimento apropriado para diagnóstico, falta de interesse científico e também ao fato dos mexilhões não serem um alimento comum nas mesas brasileiras.

A ocorrência de alguns dinoflagelados potencialmente tóxicos no Estado de Santa Catarina (CARDOSO, 1993; PROENÇA *et al.*, 1998) e a informação de muitos casos com a sintomatologia semelhante a DSP relatados por consumidores e ainda, um caso de

intoxicação massiva, ocorrida em Florianópolis em 1990, ressaltam a suspeita da possível existência da DSP no sul do Brasil (PROENÇA *et al.*, 1998).

É importante ressaltar que a presença dessas toxinas em frutos do mar contaminados, não necessariamente resulta em intoxicação humana. Os níveis aceitáveis para DSP, diferem significativamente entre países. A dose mínima conhecida de AO que induz sintomas tóxicos em humanos adultos tem sido estimada entre 40 - 48 μg (BOTANA, 1996). No entanto, existe um consenso de que os mexilhões contendo mais que 2 μg de AO por grama de hepatopâncreas sejam considerados inadequados para o consumo humano (PARK, 1995; BOTANA, 1996; VIEYTES *et al.*, 1997).

Várias metodologias têm sido desenvolvidas para a identificação, quantificação e a detecção dessas toxinas, incluindo ensaios químicos, imunológicos e bioensaios (YASUMOTO *et al.*, 1980; MURAKAMI *et al.*, 1982; BONI *et al.*, 1990; DICKEY *et al.*, 1990; VOLTERA *et al.*, 1990; CHEN *et al.*, 1993; LUU *et al.*, 1993; DRAISCI *et al.*, 1995; FERNANDEZ *et al.*, 1996; CARMODY *et al.*, 1996).

A metodologia mais utilizada para quantificar a toxina em moluscos é o bioensaio com camundongos (YASUMOTO *et al.*, 1980). Esta metodologia foi desenvolvida pelo Ministério Japonês de Saúde e Bem Estar (1981) e é realizada através da estimativa do tempo de sobrevivência dos ratos, após a inoculação intraperitoneal do extrato dos hepatopâncreas de mexilhões nos mesmos. O resultado obtido expresso em “mouse unit” (MU), significa a quantidade de toxina capaz de matar um rato dentro de 24 horas. A toxicidade da amostra (MU/g de tecido) é determinada como a menor dose que mata dois ou mais ratos, de cada três, em um período de 24 horas (MÍGUEZ *et al.*, 1996).

III. 1.5.3. Efeitos Tóxico, Genotóxico e Tumorigênico do Ácido Ocadáico

O AO é um potente promotor de tumor (FUJIKI *et al.*, 1987), causa aumento na fosforilação de várias proteínas e distúrbios em várias funções celulares, tais como contração da musculatura lisa, biosíntese de ácidos graxos, secreção e síntese de proteínas (FERNANDEZ, 1993).

Esta toxina é um específico inibidor da atividade das proteínas fosfatase 1 e 2A (BIALOJAN & TAKAI, 1988; KUME *et al.*, 1989; COHEN, 1989; SHENOLIKAR & NAIRN, 1991; SUGANUMA *et al.*, 1992). A inibição em outras proteínas fosfatase serina e treonina, contribuiu para o estudo do efeito citotóxico do AO (HONKANEN *et al.*, 1994).

O AO é também uma substância neurotóxica (CANDEO *et al.*, 1992) e foi mostrado que é um inibidor da síntese de proteínas em um sistema acelular (cell-free system) com uma CI_{50} de 6.3×10^{-12} M⁻¹ (MATIAS *et al.*, 1996). Esta toxina marinha passa pela barreira transplacentária (MATIAS & CREPPY, 1996a) e entra no ciclo enterohepático em camundongos (MATIAS & CREPPY, 1996b).

O AO e seus derivados, quando administrados oralmente, induzem uma significativa redução nos índices de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) na mucosa gastrointestinal e na pele de roedores (YUASA *et al.*, 1994). Recentemente foi mostrado que o AO, quando administrado via oral em camundongos, entra no sistema circulatório e é distribuído para os principais órgãos, sem apresentar notadamente um órgão alvo (MATIAS *et al.*, 1999).

FUJIKI *et al.* (1997) confirmaram que a inoculação estomacal do AO, através da intubação de ratos, causa diarreia com uma acumulação de grandes quantidades de

fluidos no estômago e pouco no intestino e colo. Posteriormente os autores observaram a indução da promoção de tumor em glândulas estomacais de rato e verificaram também que o AO pode ser considerado como uma substância promotora de tumor em vários órgãos, tais como pele, glândulas estomacais e fígado, quando esta toxina é colocada na água e ingerida pelos animais.

SUEOKA *et al.* (1997) confirmaram que o AO induz a promoção de tumores em vários órgãos de camundongos. Os autores vão além, e dizem que a exposição crônica ao AO pode estar relacionada com a ocorrência de alguns tipos de câncer em humanos.

FUJIKI *et al.* (1997) observaram que, em amostras isoladas de DNA de tumores tratados com AO, foi verificado uma mutação ocasionada por uma substituição de base nucleotídica (adenina para timina) no codon 61 do gene C-H-ras de camundongos, comprovando o efeito mutagênico do AO.

AONUMA *et al.* (1991) estudaram a mutagenicidade do AO, através do Teste de Ames, e verificaram que este não induz mutação em *Salmonella typhimurium* TA100 e TA98, no entanto constataram sua mutagenicidade em células de pulmão de hamster chinês.

FESSARD *et al.* (1996) avaliaram o potencial genotóxico do AO, tanto em fibroblasto de rim de hamster recém-nascido como em queratinócitos humanos e mostraram que o AO induz a formação de adutos de DNA, indicando um efeito direto no material genético.

TOHDA *et al.* (1993) mostraram que AO, em baixas concentrações e na presença de BrdU, induz troca de cromátides irmãs tanto em linhagens de células linfoblásticas humanas (NL3) como em células de hamster chinês (CHO-K1).

MATIAS & CREPPY (1998) mostraram que o AO altera a metilação biológica do DNA em células Vero, induzindo uma hipermetilação da 5-Methyldeoxycytosina (m^5dC), confirmando o efeito genotóxico da toxina. Os autores mostraram ainda que o AO induz a lipoperoxidação, conhecida como uma manifestação de danos oxidativos e causadora de efeitos de citotoxicidade e carcinogenicidade.

De acordo com RIEBER & RIEBER (1992), o ácido ocadáico induz modificações na estrutura nuclear em células de carcinoma humano, as quais podem corresponder a estágios préneoplásico de várias formas de carcinogênese. Além disso, já foi verificado que o ácido ocadáico pode ocasionar uma rápida condensação dos cromossomos (YAMASHITA *et al.*, 1990; ISHIDA *et al.*, 1992; TOHDA *et al.*, 1993), alterações morfológicas típicas de apoptoses, tais como, fragmentação do núcleo, do cromossomo e do DNA (ZHENG *et al.*, 1994) e inibição da separação das cromátides irmãs em células mitóticas (efeito aneugênico) (GHOSH & PAWELETZ, 1992b).

MELLGREN *et al.* (1993) observaram que o AO pode agir como genotóxico em baixas concentrações, inibindo a replicação do DNA em hepatócitos de ratos.

Fica claro do exposto até aqui, que trabalhos vêm sendo realizados em mamíferos, visando detectar o potencial genotóxico e carcinogênico do AO; estes trabalhos tentam esclarecer as possíveis interações do AO com o material genético destes organismos, assim como, elucidar o mecanismo de ação do mesmo no processo de promoção de tumor. Por outro lado, a busca de métodos que permitem detectar,

precocemente, o efeito genotóxico do AO em organismos consumidos por seres humanos, tais como o mexilhão *Perna perna*, é de extrema importância não só por revelarem indiretamente a presença da toxina no ambiente, como por permitirem evitar prejuízos à cultivadores destes animais.

A relevância desta detecção precoce para as questões de vigilância sanitária são óbvias, não só por que permitem evitar a sintomatologia mais aguda (diarréia), como também porque pode permitir evitar patologias que se manifestam a longo prazo, como o câncer. Além disso, a sugestão do efeito aneugênico do AO é extremamente preocupante pois, sabe-se que grande parte das anomalias genéticas humanas estão relacionadas com aneuploidias.

III.2. Mexilhões na Ecotoxicologia

III. 2.1. Cultivo

Em 1923 o náufrago irlandês, Patrick Walton, instalou na Baía de Aiguillon-França, estacas de madeira com uma grande rede atravessada entre elas, afim de capturar aves marinhas para sua alimentação. Embora a captura de aves tenha sido limitada, Walton logo percebeu que as estacas serviam como ótimos substratos para a fixação de mexilhões, os quais tornaram-se sua principal fonte de alimento (MASON, 1971). Este sistema de cultivo denomina-se “bouchots” e compõe-se de várias estacas de madeiras enterradas no solo a uma distância de no mínimo 35 cm, formando fileiras ao longo das áreas costeiras sob influência das marés. Este tipo de sistema de cultivo, é praticamente

restrito ao litoral da França e a baía de Aiguillon é considerada o maior centro produtor do país (ANDRÉU, 1976).

Desde então, a mitilicultura vem se desenvolvendo em várias partes do mundo como na Ásia e Europa, especialmente na China, Espanha, França e Holanda, que estão entre os maiores produtores do mundo (SEED & BROWN, 1977; GOSLING, 1992).

No Brasil, o cultivo de moluscos é uma atividade relativamente recente. As primeiras idéias de mitilicultura, surgiram na década de 70; no entanto as tentativas de cultivo, ficaram mais restritas à parte de pesquisa, desenvolvimento e adaptação de tecnologia. Cultivos como atividade comercial só surgiram aqui em nosso litoral a partir de 1989 (FERREIRA & MAGALHÃES, 1995).

O cultivo de mexilhões no Estado de Santa Catarina, desenvolvido principalmente por pescadores artesanais, é uma atividade econômica importante para diversas comunidades litorâneas. Esta atividade começou em 1989, sob orientação do Laboratório de Mexilhões da Universidade Federal de Santa Catarina e a EPAGRI, e hoje o Estado é o maior produtor do Brasil e um dos primeiros da América Latina, com uma produção anual em torno de 7.500 toneladas, gerando mais de 5.000 empregos diretos (FERREIRA & GRUMANN, 1999).

Os mexilhões apresentam ampla distribuição geográfica, facilidade na obtenção de coleta e de cultivar, elevado índice de retenção de nitrogênio, apresentam alta taxa de conversão do seu alimento, transformando fitoplâncton em carne utilizável na alimentação humana e ainda são de fácil digestão e absorção pelo organismo humano e de grande valor nutritivo, tornando-os uma importante fonte de alimento (MAGALHÃES, 1985; FERNANDES, 1992). Todas as características citadas fazem do

cultivo de mexilhões uma atividade comercial rentável que vem sendo desenvolvida com sucesso (FERNANDES, 1992).

III.2.2. Aspectos da Biologia do *Perna perna*

Esses organismos, após uma fase larval planctônica, se fixam a substratos consolidados, naturais ou não, através de um conjunto de filamentos que constituem o bisso, produzido pela secreção de várias glândulas localizadas no pé do animal (BARNES, 1988). Os mexilhões chegam a formar densas populações com até 20.000 animais por metro quadrado (FERREIRA & MAGALHÃES, 1997).

Seu crescimento está relacionado às condições do ambiente, onde a temperatura e a disponibilidade de alimento, juntamente com o tempo que esses animais permanecem submersos, são fatores particularmente importantes (MAGALHÃES, 1985).

São animais considerados sésseis (fixos ao substrato), porém, com possibilidade de deslocamento lento no substrato, graças a capacidade de formação e liberação dos filamentos do bisso, com concomitante movimentação do pé (FERREIRA & MAGALHÃES, 1997).

Esses animais alimentam-se por filtração da água, através da vibração dos cílios branquiais. As brânquias permitem que ocorra entrada de água do mar pela região inalante que possuem duas funções principais: trocas gasosas e obtenção de alimento. Estima-se que esses organismos filtram em média 80 litros de água diariamente (FERREIRA & MAGALHÃES, 1995).

As células presentes na hemolinfa dos mexilhões são chamadas de hemócitos, têm função no sistema imunológico e são rapidamente acionados durante as reações de

defesa (BARRACCO, 1993). Além disso, os hemócitos estão envolvidos em uma variedade de funções fisiológicas e patológicas, incluindo transporte de nutrientes e digestão, reparo da concha, defesa interna e ainda excreção de materiais tanto de natureza biótica, quanto de natureza abiótica (CHENG, 1981). Os hemócitos, além de atuarem em todas as funções citadas, participam ativamente do ciclo reprodutivo através do transporte de uma série de nutrientes como glicogênio e proteínas, que serão utilizados no restabelecimento das gônadas após desova, durante o período de gametogênese (BURGEOT *et al.*, 1996).

Os hemócitos de *Perna perna* foram classificados por MOREIRA *et al.* (1995), seguindo critérios de MOORE & LOWE (1977) em hemócitos granulares (HG) e hemócitos hialinos tipo A (HH - A) e do tipo B (HH-B). Os hemócitos granulares são células de tamanho variável, com grande volume citoplasmático onde observam-se numerosos grânulos. Aparecem sob a forma esférica ou ovalada, com núcleos de formato irregular. Os hemócitos hialinos do tipo A são células pequenas, aparentemente indiferenciadas e têm pequeno volume de citoplasma, sendo geralmente esféricas com núcleo também esférico. Os hemócitos do tipo hialino B são células maiores, que mostram uma camada citoplasmática abundante.

Trabalhos como de WRISBERG & VAN DER GAAG (1992); JACQUES *et al.* (1996); JANERI (1996), VERNIER *et al.* (1997); KUHNEN *et al.* (1997) e JANERI (1999) mostram que a utilização de hemócitos é adequada quando se quer testar a genotoxicidade de uma substância, através do teste de micronúcleo.

Devido às suas características eco-morfo-fisiológicas, que lhe conferem grande habilidade de sobreviver em ambientes poluídos por agentes tóxicos, muitos trabalhos

utilizam os mexilhões como bioindicadores e sentinelas ideais, refletindo o nível de contaminação do ambiente aquático (marinho) em programas de monitorização de curta ou longa duração (MOORE, 1986; BAYNE, 1989; VIARENGO & CANESI, 1991).

Em estudos ecotoxicológicos, utiliza-se as respostas desses organismos, para detectar-se a presença de tóxicos no ambiente e avaliar seus efeitos biológicos (LIVINGSTONE *et al.*, 1993; LÓPEZ-BAREA, 1995). As respostas destes organismos permitem uma estimativa da severidade da exposição a que estão sujeitos (DASH, 1988).

III. 3. Genotoxicidade Ambiental

Nos últimos 10 anos, numerosos estudos têm mostrado que os contaminantes químicos dispostos no ambiente, quando ingeridos por algumas espécies de organismos marinhos, ligam-se ao DNA, podendo resultar em processos de mutagênese, teratogênese e carcinogênese (KURELEC, 1993). Nestes estudos constatou-se também que a maioria dos compostos genotóxicos são carcinogênicos (DE FLORA *et al.*, 1991).

Os compostos que atuam direta ou indiretamente sobre o DNA, produzindo efeitos detectáveis à concentrações subletais, são chamados de genotóxicos. Os agentes genotóxicos danificam o DNA, aumentando a taxa de mutação que ocorre espontaneamente em células de organismos vivos (WURGLER & KRAMERS, 1992).

No entanto, para manter a fidelidade e a integridade da informação genética, foram desenvolvidos nas células, ao longo da evolução, vários sistemas enzimáticos que reparam esses danos. Os sistemas de reparo serão eficientes somente quando os seres vivos estão expostos à baixos níveis de agentes genotóxicos (BRUSICK, 1987).

Mudanças no material genético, induzidas por substâncias genotóxicas, podem ocorrer em células somáticas e/ou células germinativas. Tanto nas células somáticas como nas células germinativas, os genotóxicos podem levar a indução, promoção e progressão do câncer e, eventualmente, morte da célula. Além disso, os efeitos genotóxicos em células germinativas podem ser passados para gerações futuras (MOSLEN & LEGATOR, 1988; DEPLEDGE, 1998; LÓPEZ-BAREA & PUEYO, 1998).

O primeiro passo para avaliar o perigo de mutágenos e carcinógenos é a detecção de substâncias mutagênicas em amostras ambientais, particularmente em organismos com grande capacidade para filtrar e concentrar os xenobióticos (LÓPEZ-BAREA & PUEYO, 1998).

Nos últimos anos, tem aumentado consideravelmente os relatos sobre a ocorrência de condições malignas e patofisiológicas em organismos aquáticos, após exposições à suspeitos genotóxicos. Devido à este contexto, os avanços no desenvolvimento de técnicas e diagnóstico, tem certamente aumentado nossa compreensão de como um organismo interage a nível molecular, celular ou individual em seu ambiente. Além disso, vários progressos substanciais têm sido realizados para avaliar a indução de danos no material genético por genotóxicas em organismos aquáticos (JHA, 1998)

No entanto, alguns autores como SCARPATO (1990), afirmam que em animais aquáticos o efeito dos genotóxicos também podem ser evidenciados sob a forma de modificações genéticas como trocas de cromátides irmãs, aberrações cromossômicas e/ou formação de micronúcleos.

III.3. 1. Métodos de Avaliação de Genotoxicidade Ambiental

Principalmente nas duas últimas décadas desenvolveu-se uma ciência denominada Ecogenotoxicologia (WÜRLER & KRAMERS, 1992) que oferece uma extensa série de metodologias para determinação de biomarcadores da exposição à genotoxinas no ambiente (CHIPMAN & MARSH, 1991).

Embora existam numerosas metodologias para detecção de danos no DNA, ainda não está claro quais os métodos mais adequados que podem ser aplicados como biomarcadores em espécies que pretende-se sejam bioindicadores aquáticos de genotoxicidade (HARVEY & PARRY, 1998). No entanto, vários autores têm sugerido a utilização de uma série de testes para se avaliar o potencial mutagênico e/ou carcinogênico de uma substância (BRUSICK, 1988; HUTCHINSON *et al.*, 1998; STEINERT *et al.*, 1998; WILSON, *et al.*, 1998). Esses testes que detectam mutagenicidade podem ser realizados tanto *in vitro* e *in vivo* como *in situ*. Uma revisão da literatura revela que a maioria das substâncias suspeitas de serem mutagênicas são geralmente avaliadas em organismos-teste, *in vitro* ou *in vivo*, e sabe-se que estes são testes eficientes quando se testa drogas específicas (RIBEIRO *et al.*, 1991).

Os testes de mutagenicidade *in vivo* devem envolver múltiplos sistemas de avaliação indicativos de toxicidade genética entre eles a determinação da frequência de células com micronúcleos, aberrações cromossômicas, ensaio cometa, a detecção da formação de adutos de DNA, citogenética de espermátócitos (MOSLEN & LEGATOR, 1988; FAHRING *et al.*, 1991; LIVINGSTONE, 1990; AGOSTINI, 1996; BUENO *et al.*, 1994; GALLOWAY *et al.*, 1996; STEINERT *et al.*, 1998; CANOVA *et al.* 1998,;).

Entre estes testes, os testes citogenéticos têm permitido identificar um grande número de agentes capazes de induzir danos no DNA, bem como fornecido informações à cerca da interação entre agentes e o DNA e seus mecanismos de reparo (NATARAJAN & ZWANENBURG, 1982).

Das metodologias citogenéticas disponíveis, o teste de micronúcleo tem sido também bastante empregado, como um teste primário para a detecção de genotoxicidade no ambiente aquático (BURGEOT, 1996; VERNIER, 1997; JANERI, 1999).

III. 3.1.1. Micronúcleos

O estudo de micronúcleos se constitui em um dos métodos para a medida de danos cromossômicos espontâneos ou induzidos, ou ainda de erros de segregação, uma vez que o micronúcleo resulta da produção de fragmentos acêntricos, ou de cromossomos inteiros que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os pólos da célula em anáfase. Quando a célula entra em telófase, tanto fragmentos acêntricos como cromossomos com quebras cromossômicas ou cromatídicas, ou ainda, cromossomos inteiros perdidos por problemas no fuso mitótico, são incluídos nas células filhas, podendo se fundir com o núcleo principal ou formar um ou mais núcleos secundários: os micronúcleos (HEDLLE *et al.*, 1983).

Segundo HEDLLE *et al.* (1983) existem 4 mecanismos reconhecidos que podem dar origem ao micronúcleo e estruturas semelhantes como: 1) perda mitótica de fragmentos acêntricos, 2) uma variedade de consequências mecânicas de quebras e trocas cromossômicas, 3) perda mitótica de cromossomos inteiros e por fim, 4) apoptose, que é uma forma de destruição nuclear em que o núcleo se desintegra e fragmentos celulares

são formados. O fenômeno da apoptose ocorre naturalmente, ou em resposta a danos celulares quimicamente induzidos, sendo que estes danos não necessitam ser de natureza genética.

A presença de micronúcleos pode ser considerada como uma indicação de ocorrência prévia de aberrações cromossômicas estruturais ou numéricas em algum momento do ciclo de vida das células (CARRANO & NATARAJAN, 1988).

O teste de micronúcleo em eritrócitos de mamíferos, *in vivo*, passou a ser melhor desenvolvido e introduzido para testar mutagênese e/ou carcinogênese por HEDLLE (1973) e SCHMID (1975).

Os micronúcleos são facilmente detectados em células interfásicas como corpúsculo intracitoplasmáticos livres (HOGSTEDT, 1984). Estes corpúsculos são pequenos, arredondados a ovais, encontrados no citoplasma normalmente ao lado do núcleo principal. A sua semelhança com o núcleo principal em forma, textura, coloração e conteúdo de DNA é que facilita sua detecção (TATES *et al.*, 1980).

O tamanho dos micronúcleos varia conforme o agente indutor. Agentes aneugênicos agem no fuso mitótico ou interferem com a formação de microtúbulos, dando origem a cromossomos que se atrasam na migração anafásica da divisão celular. Este atraso cromossômico leva à formação de micronúcleos que, por serem derivados de cromossomos inteiros, são normalmente maiores em tamanho do que aqueles derivados por agentes clastogênicos que induzem a formação de fragmentos cromossômicos ou cromatídicos acêntricos levando, conseqüentemente, à formação de micronúcleos menores (BAHARI *et al.*, 1994).

A avaliação da frequência de micronúcleos como um quantificador de dano citogenético foi usado, pela primeira vez, por EVANS *et al.* (1957), em meristema de plantas irradiadas com raio-X. Anos após, SCHROEDER (1966) *apud* BAHARI *et al.*, (1994) demonstrou que existe uma relação entre a ocorrência de micronúcleos em células de medula óssea de mamíferos e dano citogenético.

Desde então, o teste do micronúcleo tem sido amplamente utilizado tanto *in vitro* como *in vivo* e *in situ*, com a vantagem de ser simples e rápido na detecção de danos cromossômicos induzidos, além de ser bem aceito por várias autoridades regulamentatórias, incluindo o Guia de Substâncias Químicas Testadas para Mutagenicidade - Grã -Bretanha (1981) e é recomendado pela CSGMT (1995). Este tipo de teste, pode também ser usado para avaliar instabilidade cromossômica e sensibilidade a mutagênicos e/ou clastogênicos em síndromes geneticamente determinadas (AGOSTINI, 1993).

Segundo HEDLLE *et al.*(1983), as vantagens determinadas pelo método de micronúcleos são: 1) os micronúcleos podem ser observados durante toda a interfase, 2) são de fácil reconhecimento, 3) não dependem de metáfases adequadas para análise, 4) formados durante a divisão celular, persistem pelo menos através das próximas interfases, de forma que o tempo de coleta da amostra é menos crítico, 5) apresentam frequência espontânea baixa, 6) os resultados obtidos são claros em comparação com a interpretação de outros parâmetros citogenéticos, tais como falhas cromossômicas ou trocas entre cromátides irmãs e 7) os defeitos do fuso, que levam a exclusão de alguns cromossomos, também podem ser detectados.

Uma outra vantagem dos micronúcleos, é que podem ser observados em quase todos os tipos de células e a maioria pode ser empregada no estudo com humanos e animais de laboratório em observações *in vitro* e *in vivo* (TUCKER & PRESTON, 1996; EVANS, 1997).

As células mais frequentemente analisadas são as do sistema hematopoiético porque essas células são fáceis de coletar tanto em humanos como em animais de laboratório (TUCKER & PRESTON, 1996).

A avaliação da genotoxicidade em organismos aquáticos, especialmente nos mexilhões, é bastante recente. No entanto, alguns trabalhos já foram realizados para determinar danos citogenéticos, através do teste do micronúcleo, provocados por poluentes presentes no ambiente marinho.

BRUNETTI *et al.* (1992) observaram um aumento na frequência de células micronucleadas em mexilhões da espécie *Mytilus galloprovincialis*, coletados em duas áreas diferentes do Mediterrâneo durante o verão. BURGEOT *et al.* (1996) também observaram um aumento da frequência de células micronucleadas em mexilhões coletados em estações de cultivo na França, durante 4 meses.

JACQUES *et al.* (1996) observaram uma maior frequência de hemócitos micronucleados em mexilhões expostos à substâncias conhecidamente clastogênicas.

MERSCH *et al.* (1996) e VERNIER *et al.* (1997) também avaliaram a indução de micronúcleos em hemócitos de mexilhões expostos a mitomicina C, bleomicina, dicromato de potássio e ao benzopireno e verificaram um aumento na frequência de células micronucleadas nos animais expostos por 48 horas.

No Brasil, alguns trabalhos de biomonitorização citogenética ambiental têm utilizado mexilhões da espécie *Perna perna* entre eles, JANERI (1996) observou um aumento na frequência de hemócitos micronucleados em mexilhões coletados na praia de Sambaqui em Florianópolis - Santa Catarina. KUHNEN (1997) avaliou a indução de micronúcleos em mexilhões, expostos à diferentes concentrações de óleo diesel e seus resultados mostraram que, nas concentrações testadas, o óleo diesel não aumenta a frequência de hemócitos micronucleados. JANERI (1999) quantificou a frequência de hemócitos micronucleados em fêmeas de mexilhão da espécie *Perpa perna*, em diferentes estágios sexuais, coletados em diferentes locais da Ilha de Santa Catarina, seus resultados mostraram uma maior frequência de hemócitos micronucleados em fêmeas no estágio sexual IIIA do que em outros estágios .

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

IV.1. Materiais Biológicos

Os materiais biológicos utilizados neste trabalho foram:

IV.1.1. *Perna perna*

Foram utilizados mexilhões adultos da espécie *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) (MOLLUSCA:BIVALVIA), com 6 e 7 cm de comprimento (Figura 3), procedentes da Estação de Cultivo Experimental, localizada na Ilha de Ratores Grande, pertencente ao Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM - Barra da Lagoa) do Departamento de Aquicultura - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

IV.1.2. *Prorocentrum lima*

A cepa PL2V de *P. lima* (EHRENBERG) DODGE, 1975, aqui testada, foi cedida pelo professor Dr. Luiz Proença, da Universidade do Vale do Itajaí- UNIVALI. Esta cepa é proveniente do Instituto Espanhol de Oceanografia de Vigo - Espanha.

Os espécimens de *P. lima* (Figura 4) assim obtidos, foram cultivados, de acordo com o exposto no item IV.2.2., no Laboratório de Toxicologia Ambiental, integrante do Laboratório Integrado do Meio Ambiente (LIMA) do Departamento de Engenharia Sanitária Ambiental - Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).



FIGURA 3. Exemplares de *Perna perna*.

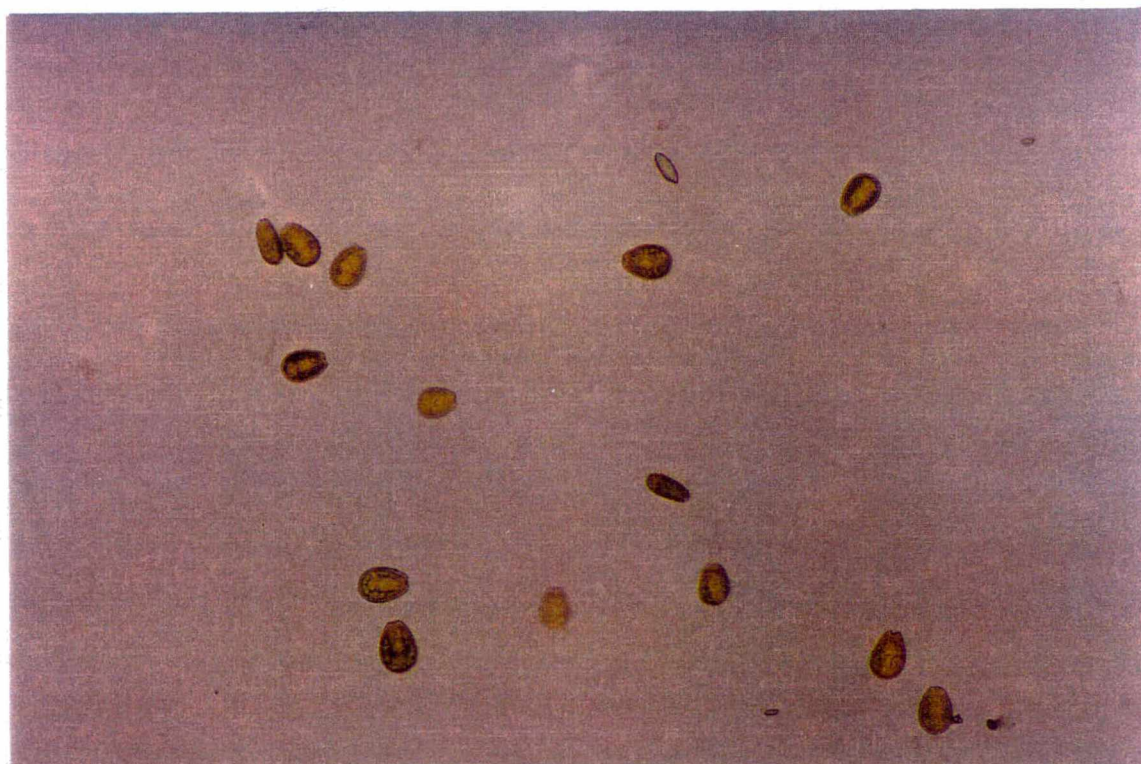


FIGURA 4. Exemplares de *Prorocentrum lima*.

IV.1.3. *Mus musculus*

Para o bioensaio com camundongos foram utilizados 3 espécimens de *Mus musculus* (linhagem Swiss), com 27 dias de idade e pesando 20 gramas, procedentes do Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos por 24 horas no laboratório em temperatura ambiente (cerca de 25°C) e permaneceram em gaiolas individuais, com ração e água. O bioensaio, está descrito no item IV.3.4.

IV.2. MÉTODOS

IV.2.1. Coleta de *Perna perna*

Os mexilhões foram coletados na estação de cultivo experimental da Ilha de Ratones Grande, situada na Baía Norte da Ilha de Santa Catarina (27°28'30''S/48°33'40'' W) (Figura 5), pertencente ao LCMM, no período de março a junho de 1999.

Nesta estação de cultivo, os mexilhões, sob a forma de sementes (organismos jovens com cerca de 2 cm de comprimento), são colocados em cordas que ficam amarradas a galões plásticos que servem como bóias, chamado de cultivo tipo espinhel. Após cerca de oito meses atingem o tamanho de aproximadamente 10 cm, e são utilizados comercialmente. Na localidade da estação o fluxo da corrente marinha é intenso, garantindo assim uma renovação contínua da água.

Uma dessas cordas com mexilhões foi retirada do cultivo e transportada para o laboratório de Moluscos em Sambaqui (pertencente ao LCMM), onde foi realizada a

limpeza externa dos animais com auxílio de jatos d'água e de uma espátula para a retirada de outros organismos que se fixam neles, como ostras e cracas.

Logo após essa primeira etapa, os animais foram transportados para o Laboratório de Toxicologia Ambiental, onde procedeu-se a parte experimental. Os animais foram transferidos para um aquário de vidro, com dimensões de 75 cm x 50 cm x 50 cm. Neste aquário foram colocados 40 Ls de água do mar filtrada e esterilizada por radiação ultravioleta, procedente do LCMM. Esta água chega ao LCMM por captação direta da praia do Moçambique - Rio Vermelho, passando por uma filtração em areia e depois por radiações ultra violeta (UV).

Os mexilhões foram mantidos neste aquário por um período de cinco dias para adaptação e tentativa de evitar a desova. O bloqueio da desova é importante para evitar o estresse dos animais que inclusive pode levá-los a morte.

Durante todo o período de adaptação os animais foram alimentados, duas vezes ao dia, com alíquotas de 500 ml de culturas de algas diatomáceas *Chaetoceros* sp. (cerca de 54×10^4 células/ml). Estas algas foram cedidas pelo LCCM e foram utilizadas como alimentação para os mexilhões em nosso trabalho. Essas diatomáceas são rotineiramente cultivadas no LCMM para manutenção dos *Perna perna*.

IV.2.2. Cultivo de *Prorocentrum lima*

Em um frasco fermentador com capacidade para cinco (05) Ls adicionou-se 1 L de meio de cultura tipo K (KELLER & GUILLARD, 1985), juntamente com 1 L de água do mar filtrada e esterilizada com UV, procedente do LCMM. Posteriormente, esta solução foi autoclavada por quinze (15) minutos a uma temperatura de 120°C. Como na maioria das vezes a mistura de meio K com água do mar, após autoclavagem, alterava a salinidade para mais de 31 ppm, diluía-se a mistura com água destilada para alcançar a salinidade desejada (29 - 30 ppm). Em seguida, adicionava-se no frasco fermentador células de *P. lima*, próximo à um bico de Bulsen, com a finalidade de evitar a contaminação do cultivo.

O cultivo foi mantido sob temperatura controlada de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fraca aeração, porém, constante. A iluminação foi mantida com luz fria, num total de 3000 Lux (Figura 6).

Semanalmente adicionava-se no frasco fermentador, 500 ml de meio K e água do mar, afim de garantir o suprimento necessário para o crescimento desses organismos.

A concentração de *P. lima* foi monitorada através da contagem de organismos em Câmara de Neubauer (1/10mm - 0,0025 mm²). Uma gota do cultivo, depois de homogeneizado, era colocada na Câmara de Neubauer para contagem em microscopia óptica a uma resolução de 10 x 100.

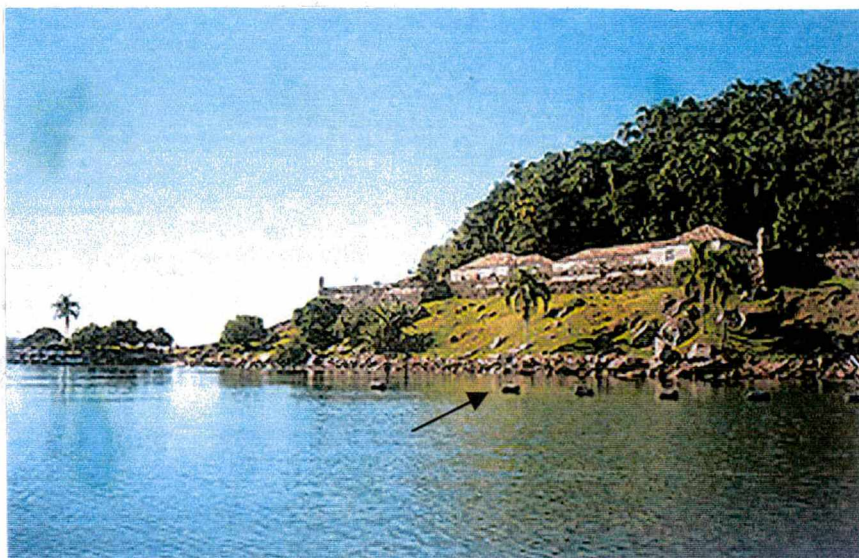


FIGURA 5. Ilha de Raton Grande onde procedeu-se as coletas. A seta evidencia as bóias nas quais estão fixadas as cordas do cultivo.

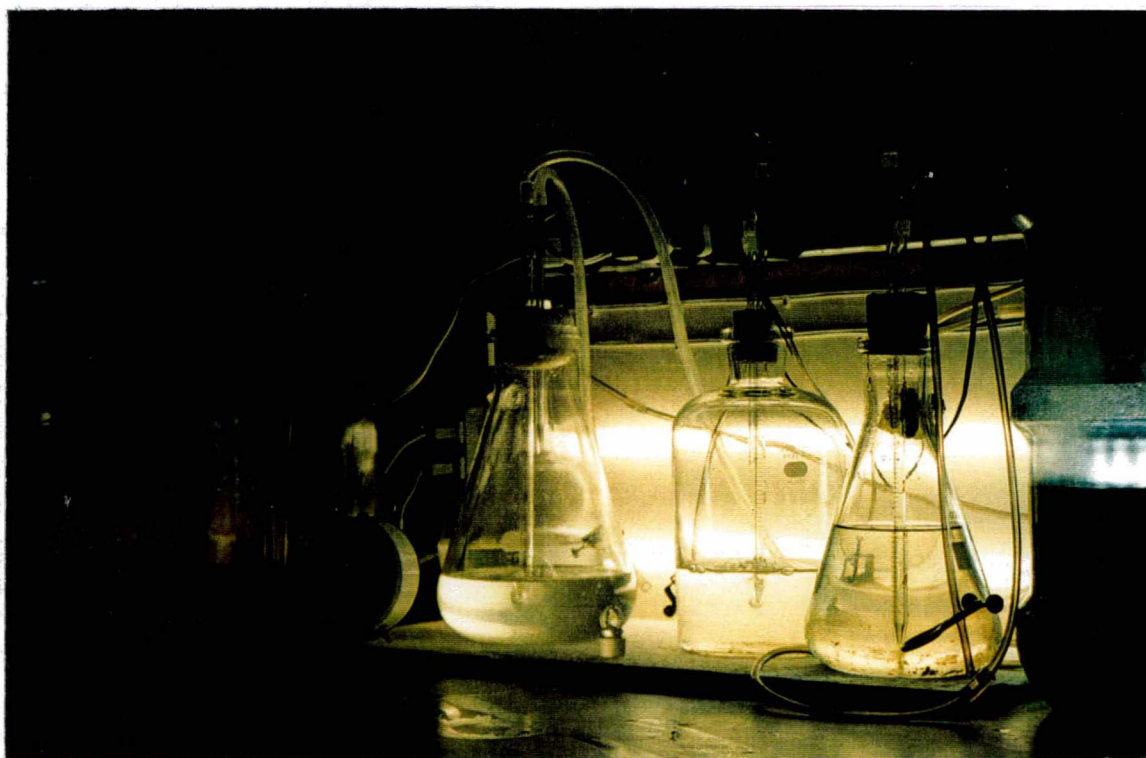


FIGURA 6. Frasco fermentador contendo o cultivo de *Prorocentrum lima*.

IV. 3. Experimentos

IV. 3.1. Exposição dos Mexilhões ao Ácido Ocadáico Puro

O AO (Research Biochemicals International) foi cedido gentilmente pelo Professor Edmundo E. Creppy da Université de Bordeaux III, U.F.R. des Sciences Pharmaceutiques, Laboratoire de Toxicologie - France.

Os mexilhões foram individualizados em recipientes plásticos de 500 ml contendo 100 ml de água do mar filtrada e esterilizada, conforme já descrito. O experimento foi realizado com 3 grupos de 09 animais cada. Os animais de um grupo receberam próximo aos seus sifões inalantes, com auxílio de uma seringa Hamilton, 0,3 µg de AO, diluído em 10 µl de água ultra pura e etanol (50:50 v/v). Nas mesmas condições experimentais, outro grupo recebeu 10 µl de água ultra pura e etanol (50:50 v/v) (solvente) e finalmente um terceiro grupo foi mantido somente em água do mar (Figura 7).

Como esse teste foi realizado em duplicata, no total, 18 mexilhões foram expostos ao AO, outros 18 animais foram expostos ao solvente (etanol + água do mar) e o ultimo grupo de 18 animais foi mantido somente com água do mar.

Os experimentos foram realizados em períodos de 24, 48 e 72 horas. Em cada período, 06 animais de cada grupo foram sacrificados e os hemócitos foram preparados para a análise citogenética (item IV.3.4).

Todos os recipientes foram monitorados quanto ao pH e OD (pHmetro e Oxímetro marca Orion).

Durante todo período do teste os animais mantiveram-se com aeração constante e a temperatura ambiente permaneceu em $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

Toda a água restante nos aquários foi autoclavada antes do descarte, afim de evitar a contaminação ambiental.

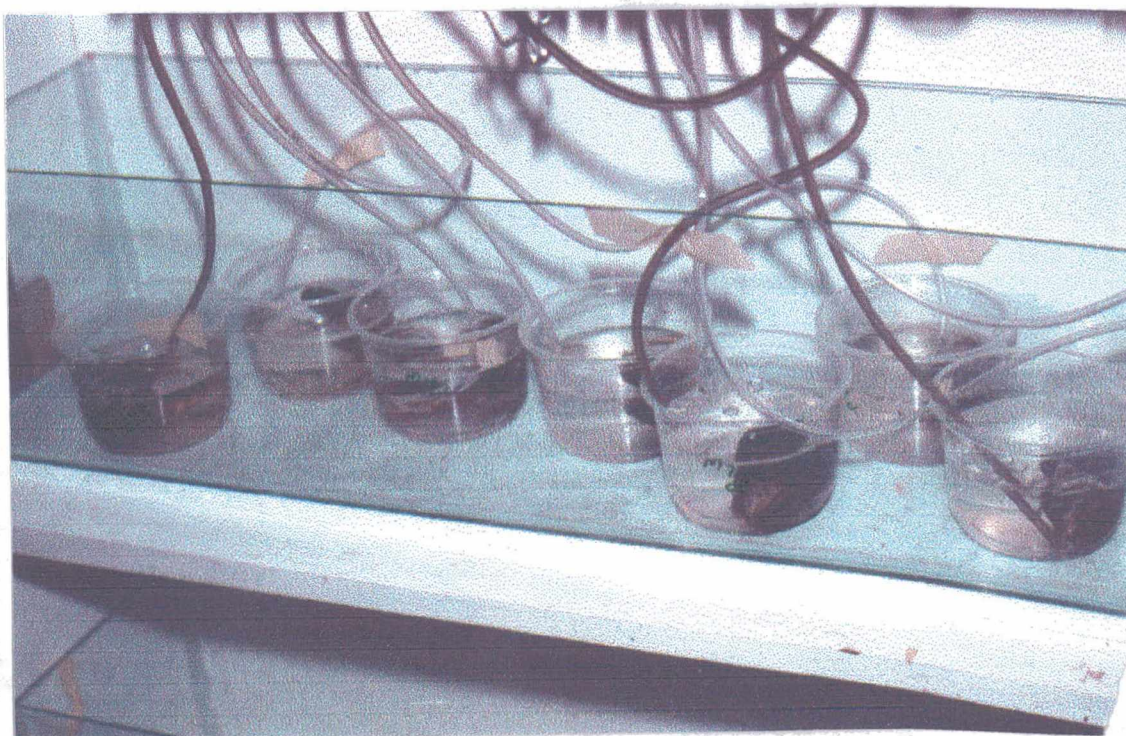


FIGURA 7. Aspecto geral do experimento com ácido oicadônico puro.

IV.3.2. Experimento dos Mexilhões Alimentados com *Prorocentrum lima*

IV.3.2.1. Preparação das Soluções de *Prorocentrum lima*

Preparou-se uma solução-mãe com $0,19 \times 10^4$ células/ml (1.900.000cél./L) de *P. lima*, através de diluições e contagem em câmara de Neubauer.

A partir desta solução-mãe foram preparadas soluções com concentrações de 200 células de *P. lima*/L, 1000 células *P. lima* /L e 10.000 células *P. lima* /L. Essas concentrações foram diluídas com água do mar filtrada e esterilizada com UV e foram estocadas em balões volumétricos. Esses balões foram totalmente recobertos por papel alumínio para evitar que os dinoflagelados continuassem crescendo, uma vez que a presença de luz é essencial para este processo.

Essas soluções serviram de alimentação diária para os mexilhões, conforme experimento descrito a seguir.

IV.3.2.2. Exposição dos Mexilhões

Estes experimentos foram realizados em aquários de vidro com capacidade para 3 L, contendo 1 L de água do mar filtrada e esterilizada por UV. Esses aquários foram mantidos com aeração constante por todo período dos testes e foram monitorados quanto ao pH e OD, com auxílio de um pHmetro (marca ORION - modelo 210A) e um oxímetro (ATI-ORION) (Figura 8).

Foram utilizados 4 grupos de 4 mexilhões, sendo um grupo considerado controle e os outros três alimentados com diferentes concentrações de *P. lima*.

O primeiro grupo foi utilizado como controle e alimentado com alíquotas de

62,50 ml de cultura de *Chaetoceros* sp (cerca de 40×10^4 células/L) quatro vezes ao dia.

No segundo grupo, quatro mexilhões foram alimentados, individualmente, 4 vezes ao dia, alíquotas de 62,50 ml, perfazendo um total de 250 ml diário, de uma solução de 200 células de *P. lima*. Nas mesmas condições experimentais, outro grupo recebeu, individualmente, como alimentação, uma solução de 1000 células de *P. lima*, 4 vezes ao dia. E finalmente um quarto grupo recebeu 250 ml de uma solução com 10.000 células de *P. lima*/animal. A alimentação com *P.lima* somente foi oferecida nas primeiras 24 horas do experimento para todos os mexilhões.

Este experimento foi repetido, nas mesmas condições, por mais duas vezes, finalizando o experimento com um tamanho amostral de 12 mexilhões em cada grupo.

Após 24 e 48 horas, foram retirados os hemócitos dos mexilhões de cada um dos grupos alimentados com *P. lima* e também do grupo controle e logo após foram preparados para análise citológica (item IV. 3.4).

Após utilização no teste, descrito acima, os mexilhões foram devidamente acondicionados em recipientes plásticos, separados por concentração utilizada, etiquetados e congelados a -20°C , para serem utilizados no bioensaio.

Após o término do experimento, com objetivo de nos certificarmos do destino dos dinoflagelados após a ingestão pelos mexilhões, realizamos análises microscópicas das fezes dos moluscos dos grupos expostos às diferentes concentrações de *P.lima*. As fezes foram retiradas dos aquários com auxílio de uma pipeta Pasteur e transferidas para um Becker. Após homogeneização com bastão de vidro, uma gota foi colocada em uma lâmina de microscopia e coberta com lamínula. A análise foi realizada em microscópio

óptico (Olympus BX40 acoplado a um microcomputador Maxtech - Pentium 100 com um programa para análise de imagem - Image Pro Plus) a uma resolução de 10 x 100.

Como realizado no experimento anterior, todo volume de água restante nos aquários foi autoclavado antes do descarte.

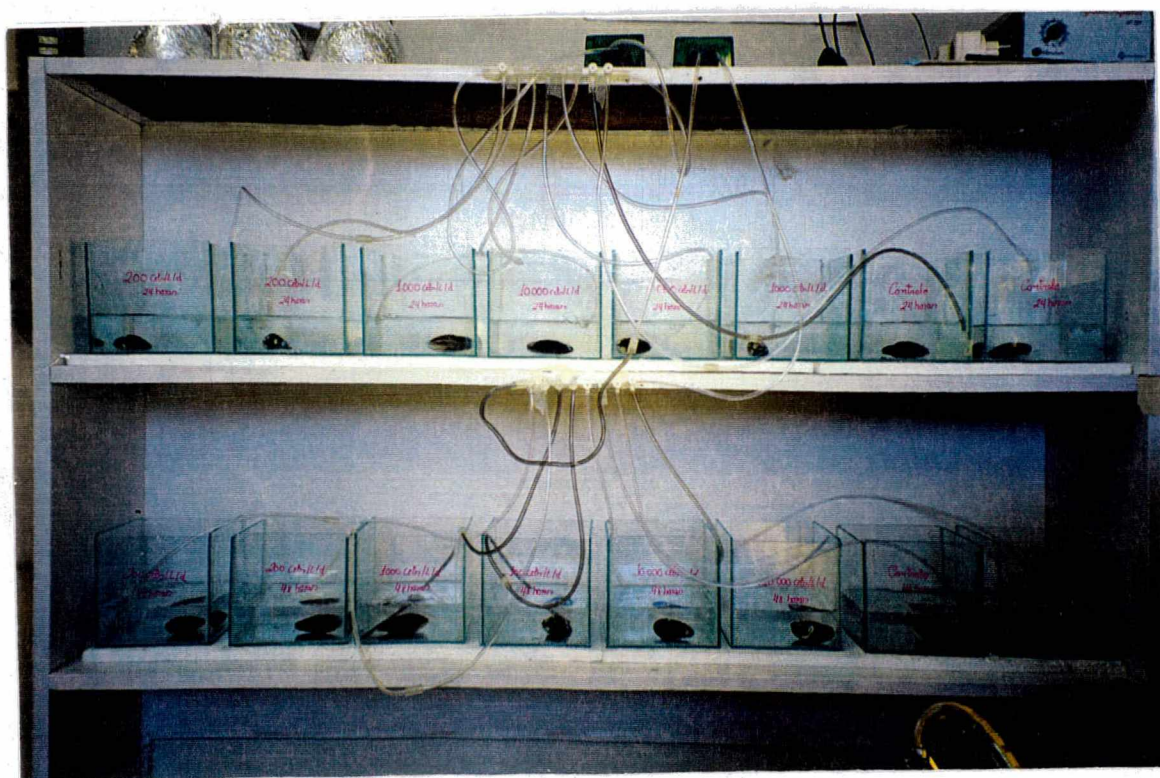


FIGURA 8. Aspecto geral do experimento com alimentação de *Prorocentrum lima*.

IV.3.3. Mexilhões Expostos a Ciclofosfamida

Este experimento foi realizado com a finalidade de testar a eficiência de aplicação do teste do micronúcleo em hemócitos de mexilhões *Perna perna* no LIMA. Além disso, foi importante para corroborar a eficiência dos organismos componentes do material de estudo deste trabalho, como bioindicadores.

A ciclofosfamida é uma substância utilizada em quimioterapia, reconhecidamente clastogênica.

A ciclofosfamida, comercializada como Genuxal (200 mg) pela Asta Médica AG Frankfurt - Alemanha, foi dissolvida em 2 ml de água destilada, perfazendo uma concentração de 100mg/mL.

Sete (07) mexilhões, individualizados em aquários de vidro com capacidade para 3 L, contendo 1 L de água do mar , foram assim tratados:

Dois (02) animais receberam, individualmente, próximo ao seu sifão inalante, com auxílio de uma seringa Hamilton, 1,25 µl da solução de ciclofosfamida (expondo os animais a 0,125 mg do produto). Utilizando a mesma metodologia, outros dois mexilhões receberam 250 µl (25 mg de ciclofosfamida). O quinto mexilhão recebeu, com auxílio de uma seringa de 3 ml, 1 ml da solução de ciclofosfamida (100 mg). Finalmente os dois últimos mexilhões foram mantidos somente com água do mar filtrada e esterilizada, sendo considerados como controle.

Nas 48 horas após a exposição, tanto os mexilhões expostos como os não expostos foram sacrificados e preparados para a análise citológica, conforme descrita no item IV.3.4. Deve ser mencionado que somente um animal foi exposto a 100 mg de ciclofosfamida, devido a escassez do produto e a dificuldade de obtê-lo no mercado.

Este experimento foi realizado em uma estufa (Estufa Incubadora modelo 347 marca FANEN) para evitar contato com o produto.

IV . 3.4. Preparações Citológicas

Para obtenção de hemócitos individualizados, com citoplasma intacto e adequados à análise de micronúcleos, foi utilizada a técnica de KUHNEN *et al.* (1997) nas preparações citológicas, que será descrita a seguir:

IV.3.4.1. Obtenção da Hemolinfa

As valvas foram abertas com a introdução de uma faca na região do bisso (ventral) e assim mantidas com o auxílio de uma pinça. Para retirar a hemolinfa utilizou-se uma seringa de 3 ml, contendo 1 ml de uma solução de metanol e ácido acético (50:50 v/v), com uma agulha 8x30 mm; a agulha foi introduzida no músculo adutor posterior (Figura 9) de onde retirou-se 1 ml de hemolinfa.

A hemolinfa assim obtida, permaneceu fixando na seringa por 7 minutos e logo após, para cada animal, foram realizados 4 esfregaços do material em lâmina de microscopia. O material foi rapidamente flambado e ainda deixado para terminar de secar a temperatura ambiente. Após esta etapa, as preparações foram fixadas por 10 minutos em metanol (P.A) e novamente deixou-se secar à temperatura ambiente.

IV.3.4.2. Coloração

A coloração foi realizada através do método Feulgen-Fast-Green, descrito a seguir.

As lâminas foram hidrolisadas em HCL 5N, à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Retirou-se as lâminas do HCL deixando sob água corrente por 10 minutos e passou-se rapidamente as lâminas, três vezes, em água destilada, deixando-se secar a temperatura ambiente. Colocou-se as lâminas no reativo de Schiff (1g Fucsina Básica, 2g Metabissulfito de Sódio, 0,4g Carvão Ativo e 20mL Ácido Clorídrico 1N - todos os produtos marca Merck), à temperatura ambiente, por 60 minutos. As lâminas permaneceram em água corrente, por 10 minutos e passou-se novamente em água destilada. Transferiu-se as lâminas para solução de Fast-Green (0,1g de Fast-Green (Sigma) em 100 ml de água destilada e 1% ácido acético) por 1 minuto, deixando-se, finalmente, secar a temperatura ambiente.

IV.3.4.3. Análise Citogenética

A análise citogenética foi realizada em microscópio óptico (Olympus BX40 acoplado a um microcomputador Maxtech - Pentium 100 com um programa para análise de imagem - Image Pro Plus) a uma resolução de 10 x 100. Este programa possibilitou-nos medir o tamanho dos micronúcleos (MN) e núcleos. O critério adotado para identificar os MN foi o de TATES *et al.*(1980) que define o MN como inclusões citoplasmáticas esféricas, apresentando contorno definido, com diâmetro de 1/10 a 1/3 em relação ao núcleo, com coloração e estrutura similar ao mesmo.

Somente células íntegras foram consideradas para análise, ou seja, com membrana celular e nuclear intactas.

Para determinar a frequência de hemócitos micronucleados (HMN) foram analisados, em teste cego, 2000 hemócitos por animal (500 hemócitos por lâmina). O teste cego consiste em recodificar as lâminas, afim de que o analisador não tenha conhecimento de qual animal e de que grupo esteja sendo analisado, evitando assim qualquer tipo de indução na leitura dos resultados.

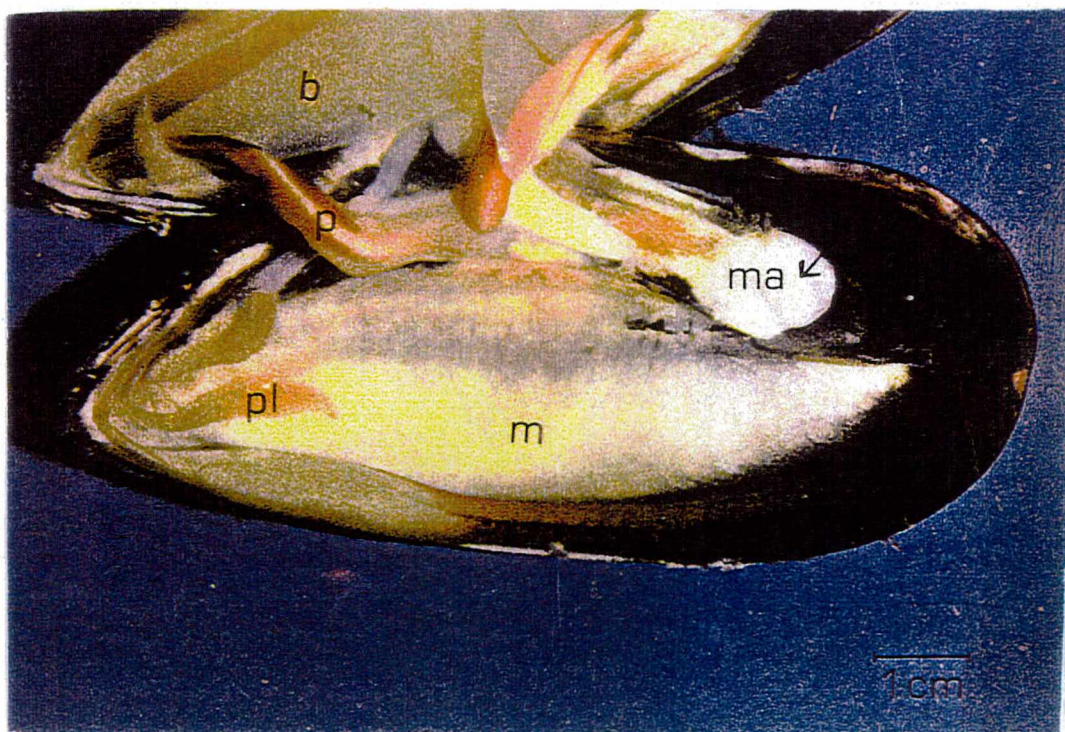


FIGURA 9. A seta evidencia o músculo adutor posterior de onde retirava-se a hemolinfa.

IV.3.5. Bioensaio com Camundongos

Os extratos utilizados neste bioensaio foram preparados com os mexilhões contaminados em condições laboratoriais. Foram utilizados os hepatopâncreas congelados dos mexilhões. O procedimento de extração da toxina utilizado foi similar ao descrito por LEE *et al.* (1987), descrito a seguir :

Limpou-se os mexilhões, externamente, com água corrente. Após abertura das valvas, retirou-se os hepatopâncreas que foram sendo agrupados conforme a concentração de *P.lima* que cada mexilhão havia sido exposto (200, 1000 e 10.000 células de *P.lima*/animal). Pesou-se 20 gramas de hepatopâncreas de mexilhões de cada grupo, e esse material foi transferido, separadamente, para Beckers onde adicionou-se 25 ml de acetona. Após homogeneização, com auxílio de um bastão de vidro, filtrou-se em papel filtro. Depois de filtrado, cada extrato foi centrifugado (centrifuga marca ALC - modelo PK 120) por cinco minutos, a 3000 rpm e reservou-se a temperatura ambiente.

Repetiu-se novamente todo o procedimento utilizando o material retirado do papel filtro. Depois destas duas etapas, juntou-se os sobrenadantes (das duas repetições), deixou-se evaporar em um banho-maria por 60 minutos a uma temperatura de 85°C, até restar, em cada becker, um resíduo de cerca de 1,5 ml. Dissolveu-se então, o resíduo em 4 ml de Tween 60 à 1%, finalizando assim, as preparações dos extratos.

Um (01) ml de cada um destes diferentes extratos, foi injetado intraperitonalmente em cada camundongo. Um camundongo recebeu um extrato preparado a partir do hepatopâncreas dos animais alimentados com 200 células de *P. lima*; um outro com 1000 células de *P.lima* e o ultimo com 10.000 células de *P. lima*.

Os animais assim tratados, foram mantidos em “mouse packs” a uma temperatura de 25°C, com comida e água a disposição.

IV. 4. Análises das Águas Utilizadas nos Experimentos

IV. 4.1. Parâmetros físico-químicos e biológicos

As águas de origem e manutenção dos animais, nas quais os mesmos foram coletados e mantidos, foram analisadas quanto às suas propriedades, através dos seguintes parâmetros e instrumentos de avaliação:

a) pH (pHmetro marca ORION - modelo 210A), b) Turbidez (turbidímetro marca HACH - modelo 2100P), c) Condutividade, d) Temperatura, e) Salinidade (estes parâmetros foram avaliados com equipamento marca ORION- modelo 115).

Além destes foi feita a análise de colimetria (método Colilert), cromatografia iônica (Dionex - DX120) para análise de cloretos, nitratos e sulfatos e Carbono Orgânico Total (COT- 5000A - Shimadzu), que permite medir a quantidade de matéria orgânica presente na amostra.

IV.4.2. Coleta e Manutenção das Águas

Na Ilha de Ratonas Grande e na Praia do Moçambique foram coletadas duas amostras de 150 ml de água em frascos plásticos esterilizados. Colocou-se os frascos diretamente na água a uma profundidade de 1 m. Após a coleta, os frascos foram devidamente fechados e mantidos sob refrigeração até chegada ao laboratório de toxicologia, onde procedeu-se as análises.

A água utilizada nos experimentos foi coletada no LCMM (captada por este laboratório da praia do Moçambique). Essas amostras foram coletadas diretamente dos recipientes plásticos de 20 Ls, que foram trazidos para o Laboratório de Toxicologia e foram mantidas com aeração constante.

IV. 5. Análise Estatística

Foram realizadas as seguintes comparações:

- a) Frequência de hemócitos micronucleados entre o grupo exposto ao AO puro e os grupos controles.
- b) Frequência de hemócitos micronucleados entre o grupo exposto ao AO puro e os grupos controles em diferentes períodos de exposição.
- c) Frequência de hemócitos micronucleados entre os grupos alimentados com diferentes concentrações de *P. lima* e o grupo controle.
- d) Frequência de hemócitos micronucleados entre os grupos alimentados com diferentes concentrações de *P. lima* e o grupo controle, nos diferentes períodos de exposição.

Todas as comparações foram analisadas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando-se significantes as diferenças quando $p < 0,05$ ($\alpha = 5\%$).

V. RESULTADOS

V.1. Freqüência de Hemócitos Micronucleados em Mexilhões Expostos ao Ácido Ocadáico Puro

A comparação estatística realizada, em todos os três grupos analisados, entre os experimentos I e II não mostrou diferença estatisticamente significativa, sendo portanto considerados como mesmo experimento (Ao puro $p = 0,231$; Solvente $p = 0,329$ e água do mar $p = 0,722$).

Os resultados obtidos nas análises citológicas que avaliaram a freqüência de HMN (Figura 10), nos mexilhões expostos tanto ao AO, ao solvente, e à água do mar (controles), estão dispostos no ANEXO 1. A análise da tabela apresentada no Anexo 1 revela uma freqüência média (‰) de HMN de 3,47 a 9,5 ‰, com os maiores valores obtidos no grupo exposto ao AO puro. Ainda no Anexo 1 pode se observar que, os números de HMN no grupo de animais expostos ao AO variaram de 02 a 29, nos animais expostos ao solvente este número variou de 01 a 21 e no grupo mantido somente com água do mar variou de 02 a 22. Estes dados revelam que a variabilidade interindividual da freqüência de HMN é bastante grande em todos os grupos.

A distribuição do número total de HMN nos animais do grupo exposto ao AO puro e os grupos controles, pode ser observada na Figura 11, onde fica claro que o grupo de animais expostos ao AO puro apresentou quase 3 vezes mais HMN (339) que o grupo de animais expostos ao solvente (129 HMN) e o grupo mantido somente em água do mar (125 HMN).

O resultado da comparação das freqüências de HMN entre o grupo exposto ao AO puro e os grupos controles, realizada com o teste de Kruskal-Wallis, foi significativamente maior nos hemócitos dos mexilhões expostos ao AO puro do que nos

outros grupos. Não detectou-se nenhuma diferença significativa quando comparou-se a frequência de HMN dos animais dos dois grupos controles entre si (etanol e água e somente água do mar (Tabela 1).

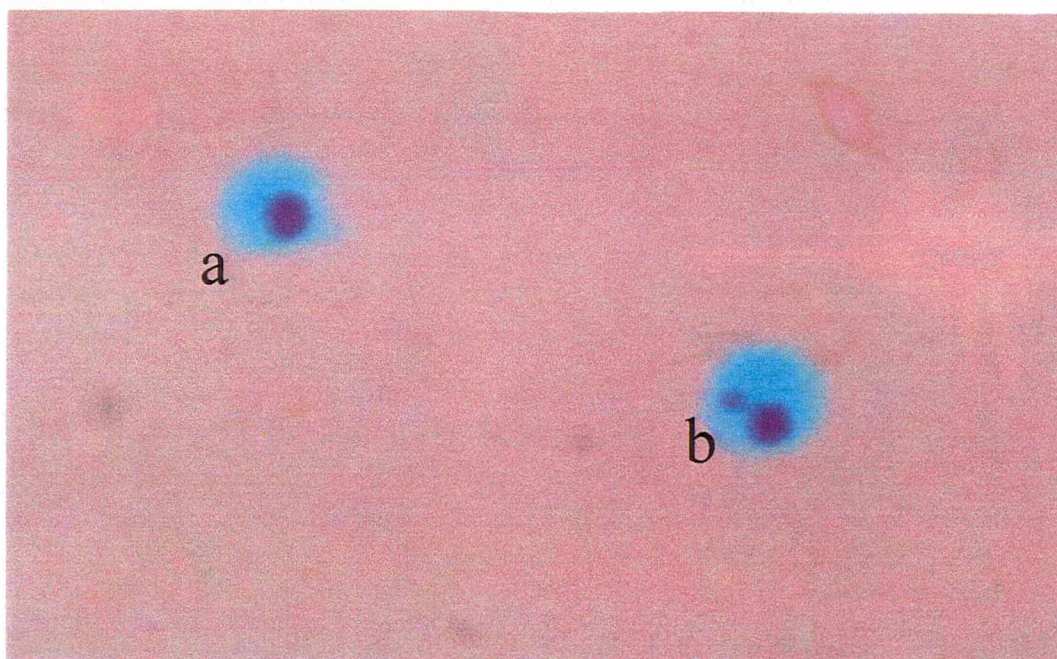


FIGURA 10. Características dos hemócitos normais (a) e dos hemócitos micronucleados (b) observados em microscopia óptica, após coloração através do método Feulgen-Fast-Green.

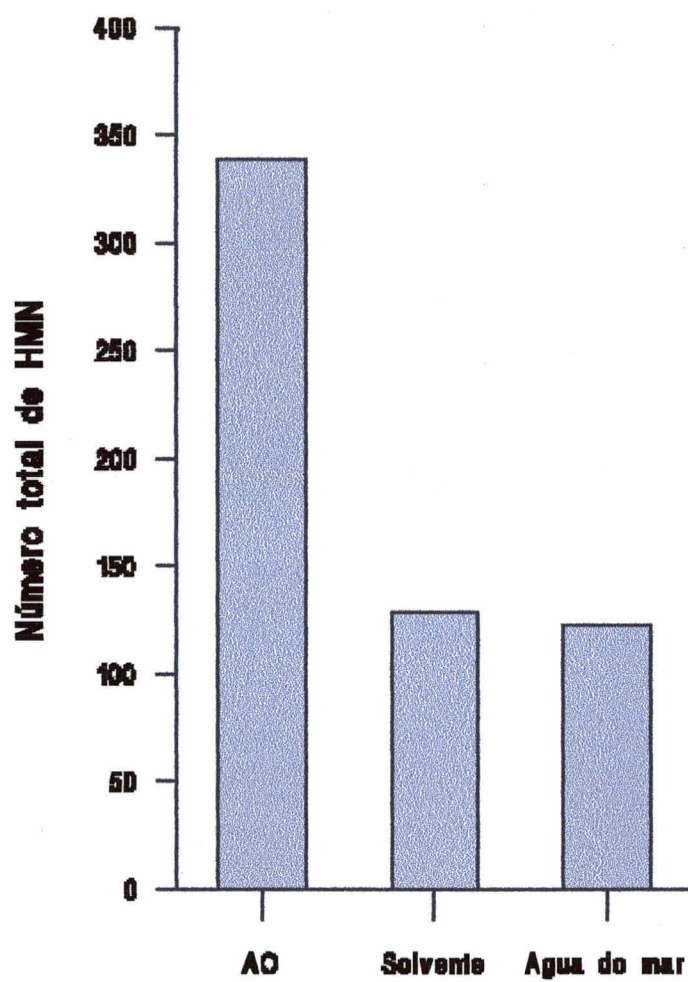


FIGURA 11. Distribuição do número total de hemócitos micronucleados no grupo exposto ao ácido ocadáico puro e nos dois grupos controles.

TABELA 1. Resultados das comparações estatísticas das frequências de hemócitos micronucleados entre os diferentes grupos.

Comparações	p
AO x Água do Mar	< 0,001
AO x Solvente	< 0,001
Água do Mar x Solvente	0,975

Os dados da distribuição do número total de HMN, por período de exposição (24, 48 e 72 horas), no grupo exposto ao AO puro e nos grupos controles estão apresentados no Anexo 1 e na Figura 12. A análise destes resultados revela que a maior frequência de HMN ocorreu no grupo de animais expostos ao AO puro por 24 horas (142). Todos os demais valores obtidos nos outros grupos foram inferiores a este.

Na Tabela 2, observa-se os dados da análise estatística da comparação das frequências de HMN, nos três grupos, nos três diferentes períodos de exposição. Os resultados revelam que a frequência de HMN no grupo exposto ao AO puro foi significativamente maior do que nos outros grupos. As frequências de HMN entre os dois grupos controles não foi significativamente diferente.

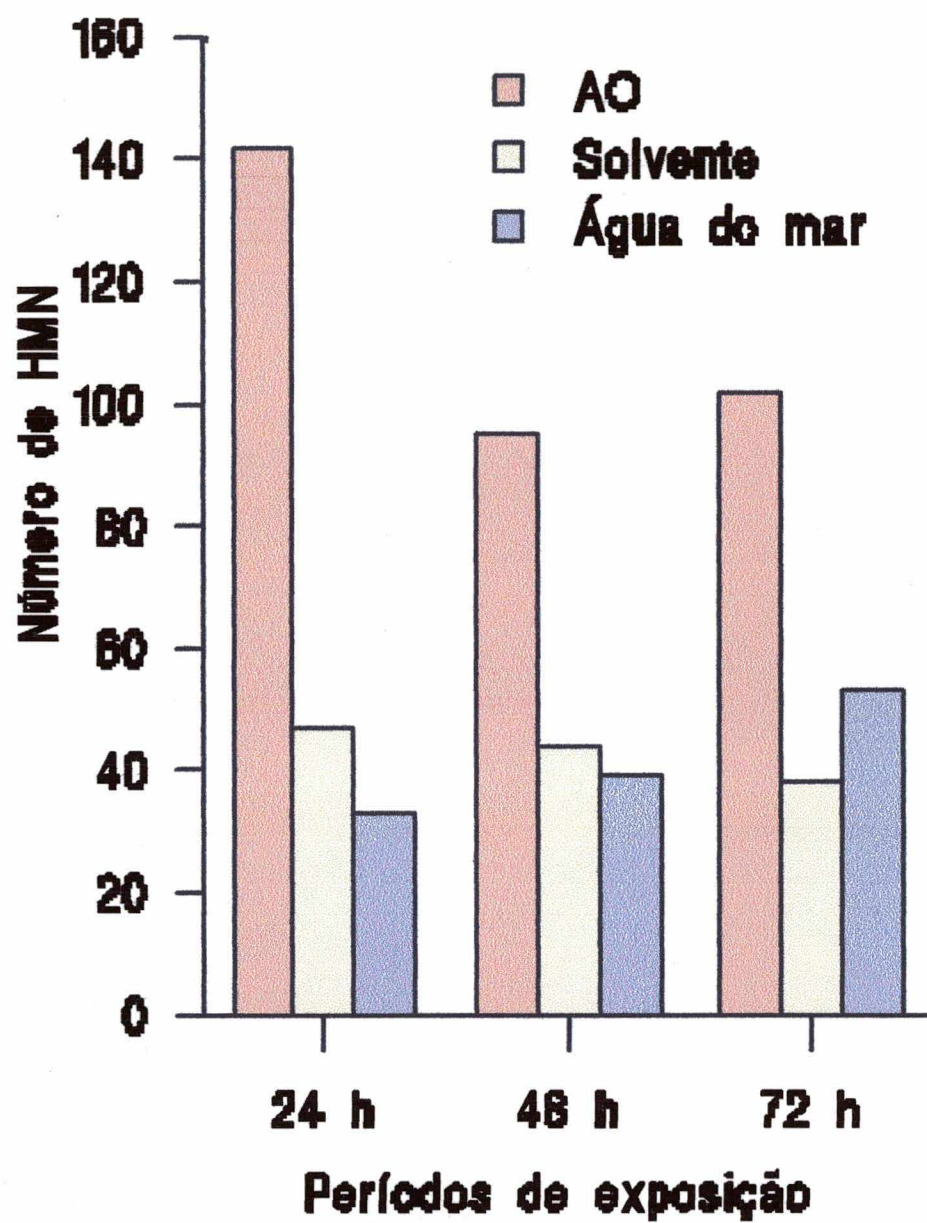


FIGURA 12. Distribuição do número total de HMN, nos três grupos experimentais, em períodos de 24, 48 e 72 horas.

TABELA 2. Resultados das comparações estatísticas das freqüências de hemócitos micronucleados entre o grupo exposto ao ácido ocadáico puro e os grupos controles, nos diferentes períodos de exposição.

Comparações	Períodos de exposição	p
Ao x Água do Mar	24 h	0,006*
	48 h	0,050*
	72 h	0,024*
Ao x Solvente	24 h	0,010*
	48 h	0,050*
	72 h	0,036*
Água do Mar x Solvente	24 h	0,936
	48 h	0,809
	72 h	0,872

* - significativo

V. 1.1. Morfologia Nuclear

A média dos diâmetros dos micronúcleos e núcleos, medidos durante a análise citológica, pode ser observada na Tabela 3. Foi calculada a média total de 102 MN encontrados no grupo exposto ao AO puro, 80 MN encontrados no grupo exposto ao

solvente e 60 no grupo mantido em água do mar. Observa-se que os valores dos diâmetros dos núcleos variaram de 1,73 a 2,17 μ m, com média e desvio padrão de 1,90 \pm 0,12 e dos micronúcleos variaram de 0,56 a 0,74 μ m, com média e desvio padrão de 0,63 \pm 0,05. A proporção do diâmetro do micronúcleo em relação ao núcleo foi de 1/3.

Foram encontradas outras anomalias nucleares, que foram aqui descritas como células com micronúcleo grande (acima de 1/3 do diâmetro do núcleo), micronúcleo aderido ao núcleo e micronúcleo formando uma ponte com o núcleo (Figura 13). Como a incidência dessas anomalias foi baixa, estas não foram quantificadas neste estudo.

V.1.2. Resultados das Análises dos Parâmetros Físico-Químicos

Os dados do potencial hidrogeniônico (pH), oxigênio dissolvido (OD) e temperatura da água nos aquários controles, estão dispostos na Tabela 4. Diante desses dados, podemos verificar que a temperatura da água manteve-se à 25°C nos três períodos de exposição. As médias dos pH variaram entre 7,28 \pm 0,13 a 7,60 \pm 0,11, nos grupos controles. A média de OD variou de 4,74 \pm 0,54 a 6,0 \pm 0,60mg/L no decorrer dos três dias de experimento, sendo que consumo do OD aumentou com o teste, e o maior consumo de oxigênio foi verificado em 48 horas nos mexilhões do grupo exposto ao solvente.

Os valores de pH, OD e temperatura da água nos aquários que continham o AO puro estão dispostos na Tabela 5. A temperatura da água também manteve-se a 25°C em todos os períodos. Nos três dias de experimento a média do pH variou de 7,32 \pm 0,20 a 7,49, \pm 0,10, constatando-se que o pH foi mais baixo logo após a injeção do AO nos aquários (7,32).

Verificou-se que os valores do OD, durante os períodos do experimento, variaram de $4,84 \pm 0,11$ à $6,01 \pm 0,66 \text{ mg/L}$. Diante desses dados observa-se que o consumo de oxigênio aumentou durante o experimento. O maior consumo de oxigênio foi observado logo após a injeção do AO nos aquários ($4,84 \text{ mg/L}$) e após 72 horas da injeção do mesmo ($4,98 \text{ mg/L}$).

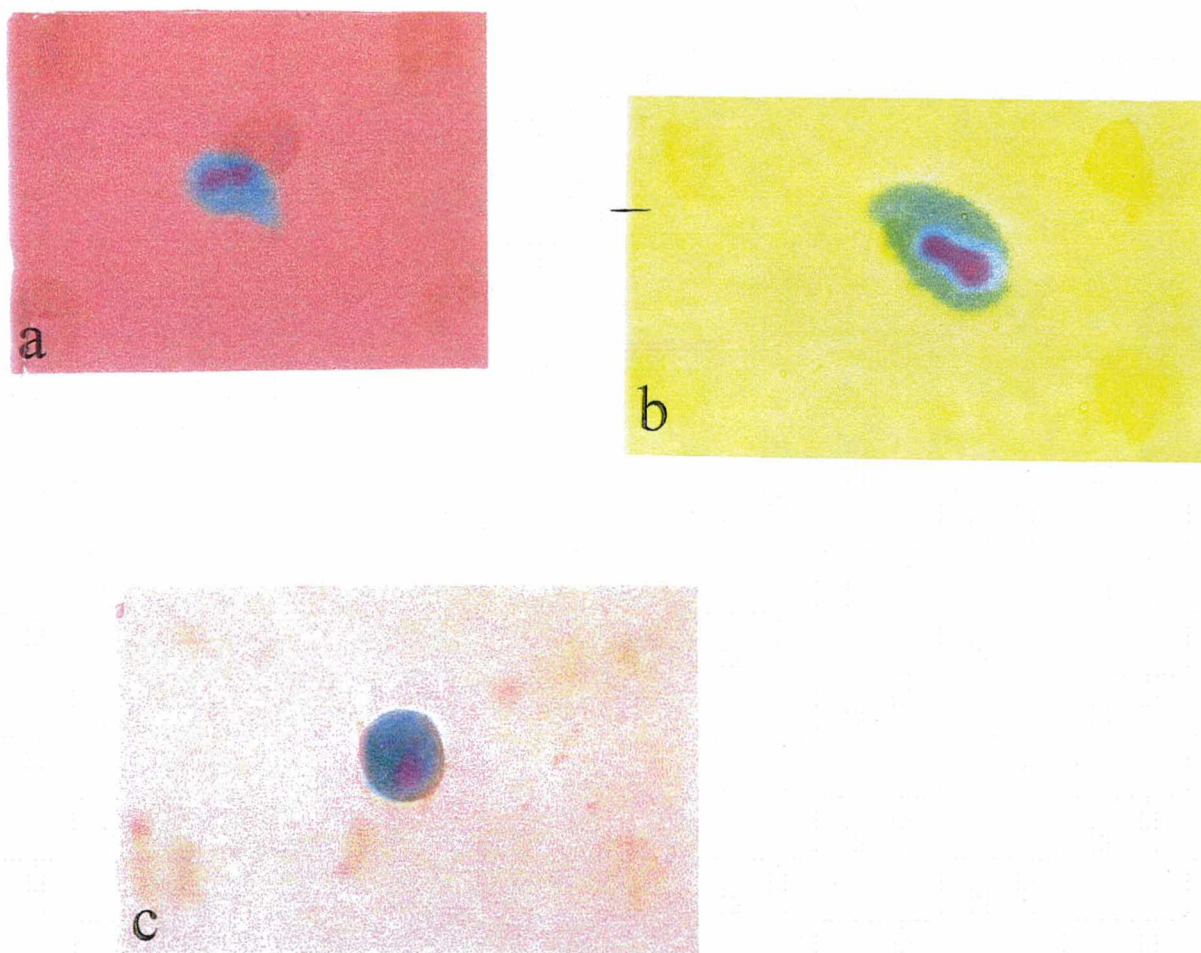


FIGURA 13. - Anomalias nucleares encontradas nas análises citológicas realizadas pelo analisador de imagem "Image Pro Plus": a) micronúcleo grande, b) micronúcleo aderido ao núcleo e c) micronúcleo em ponte.

TABELA 3. Média, desvio padrão e valores máximos dos diâmetros dos núcleos e micronúcleos encontrados nas análises citológicas realizadas pelo analisador de imagem “Image Pro Plus”.

Medidas	Núcleo (Máx. - Mín.)	Micronúcleo (Máx. - Mín.)	Proporção MN/N*
Diâmetro (µm)	1,906±0,12 (2,17 - 1,73)	0,633±0,05 (0,74 - 0,56)	1/3

*N=Núcleo e Mn=Micronúcleo

TABELA 4. Média e desvio padrão dos valores de pH, OD e temperatura da água obtidos nos aquários controles.

Tratamentos	Períodos	pH	OD (mg/L)	Tem. água (°C)
Solvente	Inicial	7,5	6,2	25
	24 horas	7,39±0,13	5,56±0,60	25
	48 horas	7,60±0,11	4,74±0,54	25
	72 horas	7,50±0,152	4,83±0,17	25
Água do Mar	Inicial	7,3	6,8	25
	24 horas	7,28±0,13	6,0±0,60	25
	48 horas	7,45±0,11	5,30±0,54	25
	72 horas	7,50±0,152	5,87±0,17	25

TABELA 5. Média e desvio padrão de pH, OD e temperatura da água obtidos nos aquários contendo o ácido ocadáico puro.

Períodos	pH	OD (mg/L)	Temperatura da água (°C)
Inicial	7,45	6,0	25
Logo após injeção do AO	7,32±0,20	4,84±0,66	25
24 horas	7,39±0,224	6,01±0,897	25
48 horas	7,49±0,10	5,05±0,515	25
72 horas	7,42±0,27	4,98±0,11	25

V.2. Frequência de Hemócitos Micronucleados em Mexilhões Alimentados com Diferentes Concentrações de *Prorocentrum lima*

No ANEXO 2, estão dispostos os dados absolutos obtidos nas análises citológicas que avaliaram as frequências de HMN, em mexilhões alimentados com diferentes concentrações de *P. lima*. As frequências médias de HMN variaram, entre os diferentes grupos, de 1,31 a 5,29 ‰, sendo que a maior frequência absoluta de HMN é observada no grupo de animais alimentados com 1000 células/animal e amostrados após 24 horas. O número total de HMN entre os mexilhões alimentados com 200 células de *P. lima* variou de 02 a 32, nos animais alimentados com 1000 células variou de 01 a 27 e nos animais alimentados com 10.000 células, o número HMN variou de 02 a 09. Nos animais do grupo controle, o número de HMN variou de 0 a 13. Estes dados revelam que existe uma variabilidade interindividual em todas as exposições, tal qual a observada no experimento de exposição dos mexilhões ao AO puro.

Na Figura 14 mostra-se a distribuição dos números totais de HMN observados nos diferentes grupos de animais alimentados com *P. lima* e nos animais do grupo controle. O Anexo 2 e a Figura 14, mostram que o maior número de HMN foi observado nos animais alimentados com 200 células de *P. lima*/animal (127 HMN). Seguidos dos animais do grupo alimentado com 1000 células (105 HMN) e 10.000 células (53 HMN) e no grupo controle foi observado o menor número de HMN (29).

As análises estatísticas das comparações das frequências de HMN entre os grupos de animais alimentados com 200, 1000 e 10.000 células de *P. lima* /animal e o grupo controle (Tabela 6), mostraram uma diferença significativamente maior nos hemócitos

dos mexilhões expostos as diferentes concentrações de *P. lima*. Por outro lado, nas comparações das frequências de HMN entre os grupos que receberam diferentes concentrações de *P. lima*, como dieta, apenas observou-se uma diferença significativamente maior nos hemócitos dos mexilhões alimentados com 200 células quando comparado ao grupo de animais alimentados com 10.000 células/animal ($p=0,022$).

TABELA 6. Resultados das comparações estatísticas das frequências de hemócitos micronucleados entre os grupos de mexilhões alimentados com *Prorocentrum lima* e o grupo controle.

	Concentrações de <i>Prorocentrum lima</i>		
	200 cel./an.**	1000 cel./an.**	10.000 cel./an.**
Controle	0,0024*	0,0422*	0,0399*
200 cels./ani.	—	0,622	0,022*
1000 cels/ani.	—	—	0,353

* - significantes

**cel./an. =células de *Prorocentrum lima* /animal

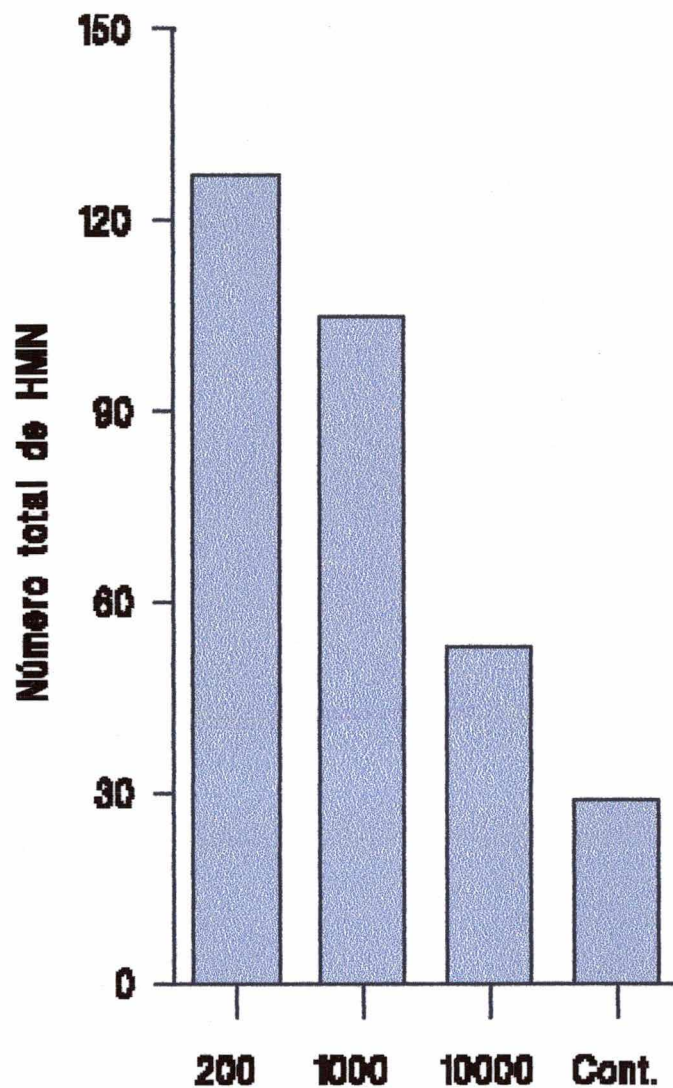


FIGURA 14. - Distribuição do número total de hemócitos micronucleados, nos grupos de mexilhões alimentados com diferentes concentrações de *Prorocentrum lima* e no grupo controle(HMN = Hemócitos micronucleados; 200 = 200 células de *P. lima*/animal; 1000 = 1000 células de *P. lima*/animal; 10000 = 10000 células de *P. lima*/animal; cont = grupo controle).

Na Figura 15 observa-se a distribuição do número total de HMN, nos grupos de animais alimentados com diferentes concentrações de *P. lima* e nos animais do grupo controle, em diferentes períodos de exposição. Verifica-se no Anexo 2 e na Figura 15 que o maior número de HMN ocorreu nos animais alimentados com 1000 células de *P. lima* e amostrados após 24 horas (68 HMN). No grupo de animais alimentados com 200 células, o número de HMN foi muito semelhante nas 24 e 48 horas após o experimento (64 e 63 HMN), respectivamente. O menor número de HMN foi verificado nos animais do grupo controle após 48 horas (7 HMN).

Na Tabela 7, estão dispostos os dados das análises estatísticas das frequências de HMN nos grupos de animais alimentados com diferentes concentrações de *P. lima* e no grupo controle, nos diferentes períodos de exposição. A análise destes resultados mostra que entre os animais alimentados com 200, 1000 e 10000 células/animal, após 24 horas, e o controle não houve diferença estatística. A única diferença significativa observada na frequência de HMN em 24 horas, foi verificada nos animais do grupo alimentado com 200 células, quando comparado ao grupo alimentado com 10.000 células de *Prorocentrum lima* ($p= 0,029$). Após 48 horas, todos os grupos alimentados com as diferentes concentrações de *Prorocentrum lima*, diferiram estatisticamente do grupo controle. No entanto, não foi observada diferença estatística entre os grupos alimentados com diferentes concentrações de *P. lima* entre si.

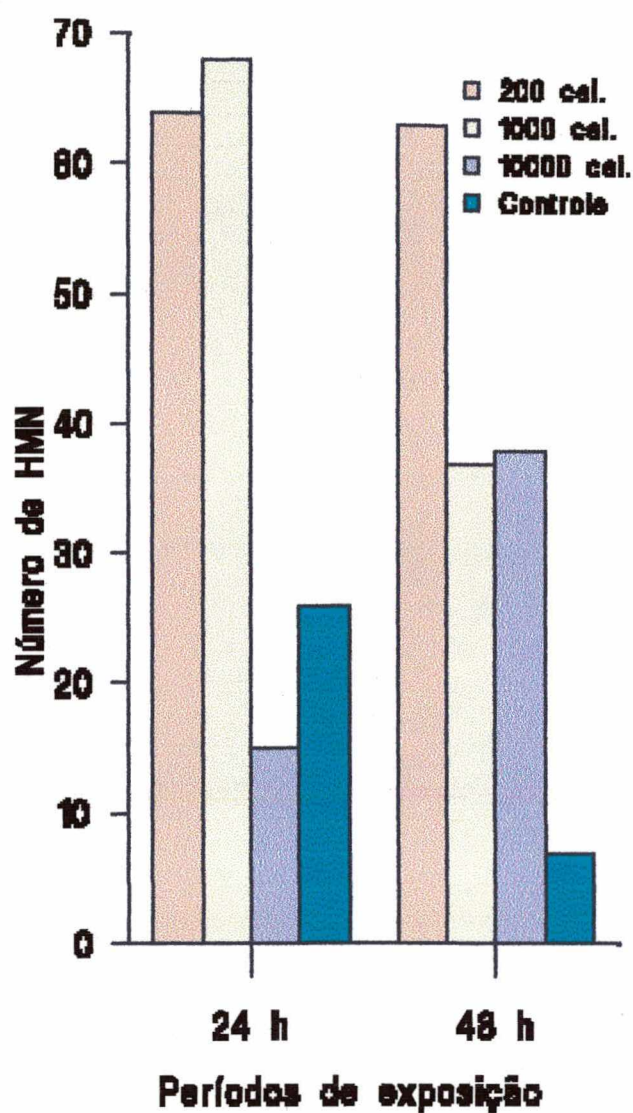


FIGURA 15. - Distribuição do número total de hemócitos micronucleados, nos grupos de mexilhões alimentados com diferentes concentrações de *Prorocentrum lima* e no grupo controle em diferentes períodos de exposição (HMN = Hemócitos micronucleados; 200cel. = 200 células de *P. lima*/animal; 1000cel. = 1000 células de *P. lima*/animal; 10000cel. = 10000 células de *P. lima*/animal.)

TABELA 7. Resultados das comparações estatísticas das frequências de hemócitos micronucleados, entre os grupos alimentados com diferentes concentrações de *Prorocentrum* e o grupo controle, nos diferentes períodos de exposição.

Comparações	Períodos de exposição	p
200 cels. x Controle	24 h	0,147
	48 h	0,005*
1000 cels. x Controle	24 h	0,288
	48 h	0,0263*
10.000 cels.** x Controle	24 h	0,870
	48 h	0,005*
200 cels.** x 1000 cels.	24 h	1,00
	48 h	0,377
200 cels.** x 10.000 cels.	24 h	0,029*
	48 h	0,260
1000 cels.** x 10.000 cels.	24 h	0,257
	48 h	0,626

* - significantes

**cels= células de *Prorocentrum lima*/animal

V.2.1. Morfologia Nuclear

As médias dos diâmetros dos MN e núcleos, medidos durante a análise citológica, estão dispostas na Tabela 08. Foi calculada a média total de 132 MN. Podemos observar que os valores dos diâmetros dos núcleos variaram de 1,27 a 3,17 μ m, com média e desvio padrão de $1,99\pm0,482$ e dos MN variaram de 0,14 a 0,72 μ m, com média e desvio padrão de $0,50\pm0,19$. A proporção média do diâmetro do micronúcleo em relação ao núcleo foi de 1/4.

V.2.2. Resultados das Análises dos Parâmetros Físico-Químicos

Durante todo o experimento foram monitorados pH, OD e temperatura da água nos aquários contendo diferentes concentrações de *P. lima* e nos aquários controles, cujos dados estão dispostos na Tabela 09. Observamos nesta Tabela que a temperatura da água manteve-se a 25°C em todos os aquários do teste. Nos aquários contendo diferentes concentrações de *P. lima* e nos aquários controles, em períodos de exposição de 24 e 48 horas, o valor médio do pH foi de $7,05\pm0,04$ à $7,48\pm0,21$. Os valores médios de OD, variaram de $5,51\pm0,044$ à $6,57\pm0,41$ mg/L, sendo que o maior consumo de oxigênio (5,51mg/L) foi observado nos animais alimentados com 200 células de *Prorocentrum lima*, após 48 horas de exposição.

TABELA 08. Média, desvio padrão e valores máximos e mínimos do diâmetro dos micronúcleos e núcleos encontrados nas análises citológicas, no experimento de alimentação dos mexilhões com *Prorocentrum lima*.

Medidas	Núcleo (Mín. - Máx.)	Micronúcleo (Mín. - Máx.)	Proporção Mn/N*
Diâmetro (µm)	1,99±0,48 (1,27 - 3,17)	0,50±0,19 (0,14- 0,72)	1/4

TABELA 09. Média e desvio padrão de pH, OD e temperatura da água obtidos durante a alimentação dos mexilhões com *Prorocentrum lima* e nos aquários controles.

		Grupos			
Parâmetros	Período de exposição	200 cel/an	1000 cel/an	10000 cel/an	Controle
pH	Inicial	7,09	7,5	7,8	
	24 horas	7,06±0,23	7,19±0,11	7,12±0,19	7,48±0,21
	48 horas	6,73±0,04	7,05±0,04	7,14±0,02	7,17±0,03
OD(mg/L)	Inicial	6,5	6,3	6,5	
	24 horas	5,58±0,60	6,10±0,57	6,02±0,77	6,47±0,33
	48 horas	5,51±0,44	6,08±0,30	5,75±0,77	6,57±0,41
Temperatura da água(°)	24 horas	25	25	25	25
	48 horas	25	25	25	25

Os resultados das análises das fezes dos mexilhões alimentados com diferentes concentrações de *P. lima* e em diferentes períodos de exposição estão apresentados na tabela 10. Estes resultados revelam que nas fezes dos animais alimentados com 200 células de *P. lima*, após 24 horas, haviam mais carapaças vazias do que *P. lima* inteiros; nas fezes dos animais que receberam a mesma concentração de alimentos, porém após 48 horas, observou-se um número bastante próximo de carapaças e *P. lima* inteiro (06 e 08 respectivamente). Nos animais alimentados com 1000 células, após 24 horas, verificamos a presença de 12 carapaças e de 26 *P. lima* inteiros, e após 48 observou-se 10 carapaças e 28 *P. lima* inteiros (Figura 16).

TABELA 10. Total de células inteiras e carapaças vazias de *Prorocentrum lima* encontradas nas fezes dos mexilhões.

Períodos de exposição	Concentrações de <i>Prorocentrum lima</i>		
	200cel./an.	1000 cel./an.	10.000 cel./an.
24 horas	20*	08*	12*
	10**	13**	26**
48 horas	06*	05*	10*
	08**	18**	28**

cel./an. = células de *Prorocentrum lima*/ por animal

* = carapaça vazia de *Prorocentrum lima*

** = *Prorocentrum lima* inteiros

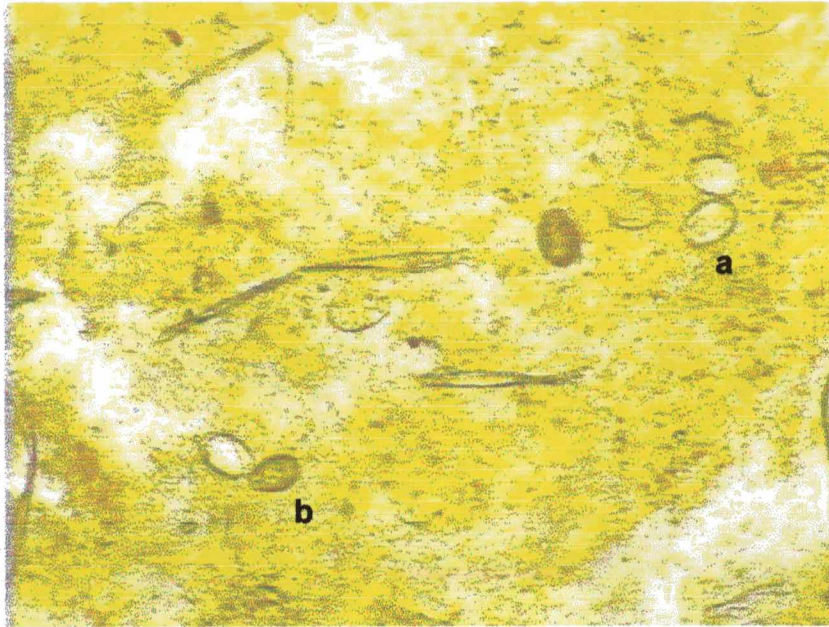


FIGURA 16. - Fezes dos mexilhões alimentados com diferentes concentrações de *Prorocentrum lima*: a) carapaça vazia e b) *Prorocentrum lima* inteiro.

V.3. Resultado do Experimento com Ciclofosfamida

Os resultados obtidos nas análises citológicas para avaliação da frequência de HMN, em mexilhões expostos a ciclofosfamida, estão dispostos na Tabela 11. Foram analisados 2000 hemócitos por animal. Estes resultados revelam que a quantidade de HMN nos mexilhões expostos a 100mg de ciclofosfamida foi de 19 MN, a quantidade de HMN nos mexilhões expostos à 0,125mg como a 25mg de ciclofosfamida foi de 05 MN, em cada grupo. No grupo controle foram observados apenas 02 HMN.

V.4. Bioensaio com Camundongos

Em nenhum dos três camundongos injetados com extratos de hepatopâncreas dos mexilhões alimentados com diferentes concentrações de *P. lima* foi verificada a morte após 24 horas .

V.5. Resultados das Análise Físico-Químicas e Biológicas das Águas dos Locais de Coleta, Manutenção e Testes dos Mexilhões

Os resultados das análises de pH, turbidez, condutividade, temperatura e salinidade, do local de coleta dos mexilhões, manutenção dos animais e da água utilizada nos experimentos, estão dispostos na Tabela 12. A análise desta Tabela mostra que o pH, entre os locais, variou de 7,95 a 8,00. Os valores para turbidez variaram de 5,02 a 5,12NTU. A temperatura mais alta (20°C) foi observada na água coletada no LCMM, e a mais baixa de 17,3 na praia de Moçambique. A condutividade variou de 40,2 a 41mS. Na Ilha de Ratoles observou-se a menor salinidade (27,7ppm), enquanto para a água coletada na praia de Moçambique e no LCMM a salinidade encontrada foi de 35

ppm. Na análise de colimetria realizada na água oriunda da Ilha de Ratonés, foi detectado 23 coliformes fecais e totais/100ml e na praia de Moçambique não foi detectada a presença de coliformes fecais e totais.

No Anexo 3, podemos observar os resultados das análises de cloreto, nitrato e sulfato, obtidas através de cromatografia iônica, da água da Ilha de Ratonés e do LCCM. Observamos que a quantidade de cloretos presentes na água do LCCM é de 17,322 mg/L, e na Ilha de Ratonés observou-se uma concentração de cloretos de 41,484 mg/L. Os valores encontrados para nitrato e sulfato no LCCM são de 0,030 mg/L e de 2,167 mg/L respectivamente. Na Ilha de Ratonés encontramos 0,0101mg/L de nitrato e 5,850mg/L de sulfato.

Os dados da análise de COT (Carbono Orgânico Total) da Ilha de Ratonés e LCMM, estão apresentados no Anexo 4. Este resultado mostra que a quantidade de matéria orgânica encontrada na Ilha de Ratonés (3,380 mg/L) é quase o dobro em relação a água do LCMM (1,840 mg/L).

Os dados referentes a cloreto, sulfato e nitrato e de COT da água coletada na praia de Moçambique não estão incluídos devido a impossibilidade de obtenção dos mesmos... ostra.

TABELA 11. Número total de hemócitos micronucleados nos mexilhões expostos a ciclofosfamida.

Número de Animal	Número de Células analisadas/animal	Quantidade de ciclofosfamida adicionada nos aquários	HMN
2	2000	0,125 mg	05
2	2000	25 mg	05
1	2000	100 mg	19
2	2000	Grupo Controle	01

HMN = hemócitos micronucleados

TABELA 12. Resultados das análises dos parâmetros físico-químicos e biológicos das águas.

Parâmetros	Locais de Coleta		
	Ilha de Ratonés Grande	LCMM	Praia do Moçambique
pH	7,99	7,95	8,00
Turbidez (NTU)	5,11	5,02	5,12
Condutividade (mS)	40,9	41	40,2
Temperatura (°C)	17,5	20	17,3
Salinidade (ppm)	27,7	35	35
Coliformes totais	23/100ml	N.R**	N.E*
Coliformes fecais	23/100ml	N.R**	N.E*

*NE=Não encontrado

**NR=Não realizada

VI. DISCUSSÃO

O ambiente aquático cobre 2/3 do planeta e é habitado pela maioria das espécies viventes, mais de 90% dos quais são invertebrados. Os organismos aquáticos e seus habitats, entretanto, têm função vital no ecossistema da terra (MACKAY, 1996).

Nos últimos anos tem aumentado muito os relatos sobre danos ao material genético provocado por substâncias genotóxicas. Essas exposições da fauna aquática à genotoxinas, num contexto ecológico, podem levar à mutações herdáveis e perda na diversidade genética, com significantes implicações para sobrevivência das populações expostas, a longo prazo. Tais exposições podem ser também um risco para saúde humana através da cadeia alimentar (JHA, 1998).

Das mudanças fisiológicas que podem ocorrer após a contaminação por exposição à genotoxinas, as mudanças permanentes no material genético, tanto de células somáticas como de células germinativas de populações expostas, são freqüentemente de extrema importância (HARVEY & PARRY, 1998). Os efeitos genotóxicos que ocorrem em células somáticas podem levar à uma disfunção e eventualmente morte da célula. Por outro lado, efeitos genotóxicos em células germinativas podem ser passados para gerações futuras. Desse modo, a genotoxicidade pode resultar em rápidas alterações na freqüência dos genes em populações naturais, com conseqüências ecológicas, as quais são insuficientemente compreendidas mas são provavelmente graves (DEPLEDGE, 1998).

Neste contexto, os efeitos dos agentes genotóxicos ambientais para os organismos justifica os trabalhos de biomonitorização do ambiente aquático utilizando-se como bioindicadores os mexilhões (BRUNETTI *et al.*, 1992; BURGEOT, 1996; KUHNEN *et al.*, 1997; JANERI, 1999).

A escolha do ensaio do micronúcleo nos trabalhos de biomonitorização citogenética resulta na facilidade e na rapidez da preparação da amostra, esta metodologia pode ser aplicada *in vivo* e permite detectar efeitos induzidos, por agentes genotóxicos presentes no ambiente, nos cromossomos (FENECH, 1997).

Nos últimos anos vários autores tem utilizado o teste do micronúcleo para avaliar danos no material genético de organismos aquáticos, induzidos por agentes genotóxicos. Resultados como de BURGEOT *et al.* (1995) e VERNIER *et al.* (1997) que encontraram uma relação dose resposta quanto a formação de micronúcleos em mexilhões e ostras tratados com benzo(a) pireno, mostram que esta metodologia é adequada quando se quer testar uma substância suspeita de ser genotóxica.

No entanto, BURGEOT *et al.* (1995) alertam para o fato de que a escolha do tipo celular pode influenciar a representatividade e a sensibilidade do teste do micronúcleo. Por outro lado, os resultados obtidos por WRISBERG & VAN DER GAAG (1992); JACQUES *et al.* (1996); JANERI (1996), VERNIER *et al.* (1997) e KUHNEN *et al.* (1997), sugerem que os hemócitos de mexilhão, aqui estudados, podem ser aplicados na avaliação da frequência de MN.

As ressalvas que podem ser feitas com relação ao uso destas células, devem-se ao fato de que existem poucos dados na literatura sobre a origem, a duração e os tipos de

hemócitos em circulação na hemolinfa de mexilhão, em geral, e em particular em *Perna perna* (BARRACCO, 1993).

Em mamíferos, o teste do micronúcleo é normalmente realizado em eritrócitos da medula óssea, dos quais se conhece a hematopoiese. Com base neste conhecimento estipula-se o tempo mínimo de exposição de um animal à droga, a fim de obter-se os eritrócitos micronucleados, induzidos pela mesma. Este tempo em geral é de 12-24 horas, com um pico máximo de célula micronucleadas ocorrendo em torno de 24-60 horas, depois do tratamento. Esta variação pode ser devida tanto a via de aplicação, como a dose, como a concentração do produto testado (MARVOURNIN, 1990 *apud* BUENO, 1997).

Como não dispõe-se de informações precisas sobre a origem e a cinética da divisão celular dos hemócitos e a sua duração em circulação, não é possível estabelecer o tempo mínimo necessário, após a exposição a droga e em particular, neste caso, ao AO, para que os hemócitos passassem por pelo menos uma divisão celular. Sendo assim, os períodos de exposição aqui testados, 24, 48 e 72 horas, foram estabelecidos empiricamente.

A concentração de AO puro, aqui empregada, foi baseada nas doses empregadas em estudos com mamíferos, por TACHIBANA (1981) e MATIAS & CREPPY (1999); a DL50 de AO em moluscos também não está descrita na literatura.

Os resultados, aqui obtidos, mostram que na concentração testada, o AO puro induz um aumento significativo na frequência de hemócitos micronucleados nos mexilhões, independentemente do tempo de exposição, o que mostra sua atividade como um agente genotóxico.

A ação genotóxica do AO já foi observada por vários autores utilizando outros tipos de testes. Os estudos realizados por AONUMA *et al.* (1991) e FESSARD *et al.* (1996) mostraram o potencial do AO em ligar-se ao DNA de células de mamíferos, induzindo possíveis alterações no material genético. MATIAS e CREPPY (1998) mostraram que a taxa da 5-methylcytosina (m^5dc) no núcleo, aumenta de 3,8 para 7,8%, indicando uma possível interferência do AO com a expressão, replicação e regulação do DNA. Aparentemente o AO induz um aumento da taxa da m^5dc através do aumento da atividade da DNA-metylase e como a metilação implica na supressão de genes, a hipermetilação induzida pelo AO constitui um evento precoce característico e um marcador sensível a sistemas vivos expostos a toxina. TOHDA *et al.* (1993) e MELLGREN *et al.* (1993), mostraram que o AO, mesmo em baixas concentrações, induz troca de cromátides irmãs em células linfoblásticas humanas e inibe a replicação do DNA em hepatócitos de ratos, confirmando sua ação como genotóxico.

Até o presente momento, não há dados na literatura mostrando a indução de micronúcleos pelo AO em nenhum organismo.

Por outro lado, vários trabalhos têm mostrado a aplicabilidade do teste do micronúcleo *in vivo* em hemócitos de mexilhão *Perna perna* e em outras espécies de bivalves, expostos a agentes reconhecidamente clastogênicos e aneugênicos (WRISBERG & VAN DER GAAG, 1992; JANERI, 1995; JACQUES *et al.*, 1996; KUHNEN *et al.*, 1997; VENIER *et al.*, 1997). Estes trabalhos mostram a aplicabilidade dos bivalves e do ensaio do micronúcleo, quando se pretende avaliar a potencialidade genotóxica de algum composto em condições laboratoriais ou também em estudo de biomonitorização ambiental.

Os resultados das análises estatísticas das frequências de HMN entre mexilhões expostos ao AO puro e os controles, em diferentes períodos de exposição, mostraram diferenças significativas entre os grupos (Anexo 1 e Figura 12), sendo que as maiores diferenças foram observadas após 24 horas. Estes dados demonstram que o efeito genotóxico do AO, a nível cromossômico, pode ser demonstrado através da metodologia empregada, sugerindo portanto um efeito rápido do AO e também uma divisão celular dos hemócitos em tempo inferior a 24 horas.

Segundo MATIAS & CREPPY (1998), esse rápido efeito genotóxico do AO pode ser devido a uma rápida transformação metabólica do AO em um composto muito ativo, durante as primeiras horas de exposição.

A tendência a diminuição da frequência de HMN após 24 horas (Figura 12) pode ser devida à: a) diminuição da atividade do metabólito genotóxico durante o experimento; b) mortalidade celular provocada por um excesso de tempo de exposição ao agente genotóxico, c) curta duração dos hemócitos na circulação e d) adaptação metabólica à um efeito crônico. De qualquer maneira, o tempo que o animal poderia suportar isto não está claro.

O mesmo pode ser dito para as frequências de HMN observadas nos animais exposto ao solvente.

Por outro lado, nos animais não expostos (mantidos somente em água do mar), a tendência a um aumento da frequência de HMN proporcional ao tempo de manutenção nos aquários, só poderá ser entendida como decorrência de fatores intrínsecos ao organismo, fato este não explorado neste trabalho, uma vez que as condições físico-química e biológica do experimento, ficaram dentro dos padrões estabelecidos.

Resultado semelhante nas frequências de HMN, aqui encontrados, com relação ao tempo de exposição, foi obtido por ROGERS & BOYES (1989), que utilizaram uma outra toxina marinha, o ácido domóico, para avaliação da genotoxicidade, utilizando o teste do micronúcleo, em hepatócitos de hamster chinês, onde observaram um aumento da frequência de hepatócitos micronucleados, durante as primeiras 24 horas de exposição.

O diâmetro médio dos micronúcleos foi medido pois alguns autores acreditam que o critério para se distinguir a origem do micronúcleo é o tamanho do mesmo, baseado no fato que o diâmetro médio dos micronúcleos induzidos por agentes aneugênicos, em geral, são significativamente maiores do que aqueles induzidos por agentes clastogênicos (VANPRAYS *et al.*, 1990).

Confrontando os resultados deste parâmetro aqui obtido (Tabela 3), com os de LIU *et al.* (1998), verifica-se que o diâmetro médio dos micronúcleos aqui encontrados é bem menor do que o verificado pelos autores. Em suas análises, LIU *et al.* (1998) encontraram uma média do diâmetro dos micronúcleos de 1,84 μm e sugerem, com base neste resultado, que o efeito do agente testado seja por quebra no DNA ou seja, que o agente seja clastogênico. A média dos diâmetros por nós obtida (0,63 μm) não nos permite concluir nada diferente de LIU *et al.* (1998), embora com base em outros parâmetros GHOSH & PAWELETEZ (1992) tenham sugerindo que o AO seja aneugênico. Acreditamos que seria muito interessante, em estudos posteriores, avaliações nesse sentido, o que elucidaria o tipo de dano que o AO causa no cromossomo, uma vez que a investigação do conteúdo do micronúcleo pode determinar se o mesmo originou-se de erro de segregação ou é resultado de uma quebra cromatídica e/ou cromossômica.

Durante todo período do experimento com o AO puro, verificamos os valores de pH e OD. Os resultados para o pH, em todos os tratamentos, estão dentro dos limites estabelecidos pela resolução nº 20/86 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que estabelece um limite de 6,5-8,5 para o pH em locais classificados como classe 5, ou seja, referentes às águas salinas que se destinam à recreação, proteção das comunidades aquáticas e à criação natural e/ou intensiva de espécies destinadas à alimentação humana.

Ao analisar os valores de OD nos aquários controles, verificamos que eles estiveram abaixo dos limites estabelecidos pelo CONAMA, que estabelece que o OD, em águas de classe 5, deve ser maior ou igual a 6mg/L. Porém, observamos que o consumo de oxigênio pelos mexilhões aumentou juntamente com o tempo de exposição. Isto, provavelmente se deve ao fato de que esses animais, em condições de cativeiro, aumentam a atividade metabólica e, conseqüentemente, consomem mais oxigênio. JANERI (1999) supõe que o aumento da frequência de hemócitos micronucleados em fêmeas de mexilhões, estudados *in situ*, em estagio sexual IIIA, pode ser devido ao aumento do consumo de oxigênio, devido a grande atividade metabólica dos animais relacionada com a fase de reprodução dos mexilhões e também com a temperatura da água ao longo do ano.

Nos aquários aqui estudados, contendo o AO puro, os valores de OD também mantiveram-se abaixo do limite estabelecido pelo CONAMA, no entanto, no período de exposição por 24 horas, onde constatamos uma maior frequência de hemócitos micronucleados, o OD manteve-se dentro do limite estabelecido (6,01 mg/L). Isto sugere,

portanto, que a frequência de hemócitos micronucleados, pelo menos nas primeiras 24 horas, provavelmente, não esteja relacionada com o aumento de consumo de oxigênio.

Uma outra observação feita a partir dos nossos resultados é quanto a variabilidade interindividual da frequência de HMN dos organismos. Esta variabilidade também foi encontrada por BURGEOT *et al.* (1995); KUHNEN *et al.* (1997) e VERNIER *et al.* (1997). Segundo KUHNEN *et al.* (1997), esta variabilidade pode estar relacionada ao papel multifuncional dos hemócitos (digestão, cicatrização, excreção, reparo da concha, etc.), tornando-os mais sensíveis à fatores exógenos e endógenos. Além disso, sabemos que fatores como temperatura, estresse, dieta nutricional e atividade reprodutiva exercem grandes influências na variabilidade interindividual (ZALESKI *et al.*, 1991).

No entanto, sabe-se muito pouco sobre a variabilidade interindividual dos organismos à susceptibilidade a poluentes ambientais, apesar dos esforços recentes dos autores que vêm trabalhando com a genética de populações dos genes metabolizantes (AU *et al.*, 1999). De qualquer forma, é indiscutível que dentro de uma população existam diferenças genéticas. Desse modo, pode-se dizer que cada organismo tem uma predisposição genética particular para metabolizar produtos genotóxicos presentes no ambiente. Além disso, os poluentes podem exercer uma pressão seletiva a qual reflete em mudanças na constituição genotípica das populações. Isto é bem visível na evolução de populações geneticamente resistentes em locais poluídos por um longo período tempo (DEPLEDGE, 1998).

Além de todos esses fatores mencionados anteriormente, de modo geral relacionados com a variabilidade genética das populações, as respostas individuais aos

agentes genotóxicos podem resultar de seu mecanismos de defesa celular, atividade metabólica, condições anti-oxidantes e o sistema de reparo do DNA (MICHELMORE & CHIPMAN, 1998).

No experimento de alimentação dos mexilhões com *P. lima* as concentrações, foram escolhidas com base em dados publicados por BOTANA *et al.* (1996) que relatam que os mexilhões, expostos a uma densidade celular de 200 cels/L, já acumulariam quantidades suficientes de AO para afetar a saúde humana. A concentração de 10.000 cels/L foi escolhida para tentar simular no laboratório uma eflorescência desses dinoflagelados.

Pode-se citár pelo menos dois motivos pelos quais este experimento torna-se relevante dentro dos objetivos aqui propostos: 1) verificar se a quantidade de 200 células de *P. lima* capaz de causar problemas a saúde humana, conforme descrito por BOTANA *et al.* (1996), também é capaz de induzir genotoxicidade nos hemócitos dos mexilhões; 2) verificar se o aumento da concentração de *P. lima* é diretamente proporcional ao aumento de genotoxicidade nos hemócitos de mexilhão da espécie *Perna perna*.

Os resultados aqui obtidos mostraram que a frequência de hemócitos micronucleados nos animais alimentados com as três diferentes concentrações, diferem estatisticamente do grupo controle (Tabela 6). Como as frequências de HMN observadas nos grupos alimentados com 200 e 1000 células de *P. lima*, foram as maiores, em relação ao controle, pode-se dizer que o AO é genotóxico mesmo em baixas concentrações. O que mostra que nesta concentração de *P. lima* o AO já esta em quantidade suficiente, além de provocar a DSP, para ser considerado genotóxico.

LEMIESZEK (1999) (comunicação pessoal) verificou, através de cromatografia líquida, que o cultivo apresentava uma concentração de AO de 0,16 pg/célula. Portanto, neste experimento, onde os animais foram alimentados com diferentes concentrações de células de *P. lima*, a exposição ao AO foi bem menor do que no experimento com AO puro, fato este, que não inibiu a genotoxicidade já observada através do teste do MN nos hemócitos.

Neste experimento os animais foram avaliados somente após dois períodos: 24 e 48 horas. Isto se deu, principalmente, por dois motivos: 1) uma vez que, os animais foram alimentados somente nas primeiras horas do teste, a fim de manter sempre a mesma concentração durante todo o período experimental, deixá-los por 72 horas sem alimentação poderia prejudicar os resultados, uma vez que é recomendável, por razões fisiológicas, oferecer alimentos à vontade à animais em experimentação; 2) o pico de formação de micronúcleos, observado no experimento anterior com AO puro, ocorreu nas primeiras 24 horas, sugerindo que o tempo de exposição proposto era suficiente para a avaliação do parâmetro pretendido.

Os resultados obtidos com esse experimento mostram que o maior número de HMN foi verificado após 24 horas de exposição. Isto está de acordo com os resultados obtidos no experimento de exposição dos mexilhões ao AO puro (Figura 12), reforçando as hipóteses sugeridas anteriormente. Um outro fato que é importante de ser salientado com relação aos resultados obtidos após 24 horas foi a tendência de que quanto maior a concentração de células de *P. lima* menor foi a frequência de hemócitos micronucleados. Supõem-se que quanto maior a concentração de AO existente nas células de *P. lima*, maior o efeito citotóxico. Se isto for verdade, pode-se pensar que estes resultados são

devidos à morte dos hemócitos, já que o AO interfere em várias funções celulares e inibe a síntese de proteínas.

MATIAS *et al.*, (1999a) verificaram que num sistema de mamíferos, *in vitro*, (células Vero), o AO puro na concentração de 15ng/ml provocou mortalidade celular.

No sistema aqui empregado (hemócitos de mexilhão) testado com o AO puro, este fato não foi observado; além disto observou-se um aumento na frequência de HMN. Portanto, uma explicação para o fato da diminuição da frequência de HMN, nos mexilhões expostos a uma maior concentração de *P. lima*, não pode aqui ser explorada, com base em nossos resultados, nem nos dados da literatura. Isto nos impede de inferir qualquer possibilidade de aumento ou diminuição de genotoxicidade, neste sistema, devido a um aumento ou diminuição da quantidade de *P. lima*.

Apesar de termos observado a tendência para um aumento no número de HMN após as primeiras 24 horas, o teste estatístico aqui, utilizado só mostrou diferença significativa dos três grupos experimentais comparados ao grupo controle no período de 48 horas. Acreditamos que um animal do grupo controle, no período de 24 horas, possa ter influenciado neste resultado, pois este animal apresentou 13 micronúcleos o que aumentou a média e o desvio padrão deste grupo. Este mexilhão, desovou durante o experimento, o que é muito comum nesses animais em condições de estresse, pois como já foi comentado, alguns autores acreditam que o estresse aumenta a frequência de micronúcleos. Mesmo assim, decidimos manter esse dado nos resultados do experimento, o que, conseqüentemente, pode ter influenciado na análise estatística.

As razões da variabilidade interindividual, também aqui observada já foram discutidas anteriormente.

O diâmetro dos micronúcleos, também foi quantificado e verificamos um tamanho médio pouco menor do que o encontrado no experimento anterior (diâmetro de $0,50\mu\text{m}$). Porém, como mencionado anteriormente, acreditamos que outros testes devem ser efetuados para que possamos pelo menos sugerir que tipo de agente indutor de genotoxicidade é o AO.

Os valores de pH estiveram dentro dos limites estabelecidos pelo CONAMA. Os valores de OD mantiveram-se abaixo do limite estabelecido pelo CONAMA nos grupos alimentados com 200 e 1000 células. No grupo alimentado com 1000 células e no grupo controle o OD manteve-se dentro dos limites estabelecidos pelo CONAMA. No entanto, não há razões para acreditar que as variações na quantidade de oxigênio dissolvido, nesse experimento, interferiram nas frequências de HMN encontradas.

Durante este experimento, foi verificada a quantidade de células inteiras de *P. lima* e de carapaças vazias que foram expulsas pelos mexilhões através das fezes. Essa quantificação foi realizada, porque os mexilhões, ao se alimentarem, selecionam as partículas quanto ao tamanho e, provavelmente, eliminam na forma de pseudo-fezes (“pellets” formados pelas partículas rejeitadas, associadas a muco protéico) ou fezes. Verificou-se que os animais alimentados com 200 células/L eliminaram mais carapaças vazias do que células inteiras. Isto talvez possa explicar a maior frequência de hemócitos micronucleados nesse grupo, uma vez que a toxina estava presente nas células e consequentemente foi acumulada. Nos animais alimentados com 10000 células de *P. lima*, encontramos o maior número de células inteiras nas fezes do que nas outras concentrações. Portanto, este grupo pode ter acumulado pouca toxina. Acreditamos que se tivéssemos realizado análises de cromatografia líquida, poderíamos ter informações

mais precisas em relação ao quanto de toxina estava presente na água dos aquários, nas fezes e nos hepatopâncreas. Sugere-se que estas análises sejam realizadas em experimentos futuros a fim de poder melhorar as interpretações dos resultados.

No experimento de exposição dos mexilhões a ciclofosfamida, as concentrações aqui aplicadas, foram baseadas em estudos feitos com roedores e humanos, uma vez que não há dados na literatura em moluscos tratados com este agente clastogênico.

Nesse experimento a quantidade de droga disponível era muito pequena e, conseqüentemente, o tamanho amostral foi reduzido, não possibilitando uma análise estatística.

Na concentração de ciclofosfamida, aqui empregada (100mg/L) foi possível observar um aumento da quantidade de HMN em mexilhões da espécie *Perna perna* (Tabela 11), em comparação ao controle. Este resultado demonstra, mais uma vez, a eficiência deste sistema (hemócitos de mexilhão) para o teste de micronúcleos nestes organismos.

No bioensaio com camundongos, não foi possível determinar a presença do AO em amostras de hepatopâncreas e nem a morte em 24 horas. A explicação para este resultado, é o fato dos mexilhões terem sido expostos a uma concentração inferior a 4 µg de AO/g de hepatopâncreas, que é segundo MÍGUEZ *et al.* (1996) a quantidade mínima suficiente de AO para matar um rato em 24 horas. Outra possibilidade é que como, para as preparações dos extratos somente foram utilizados os hepatopâncreas, a quantidade de toxina acumulada em outros tecidos foram subestimadas. Realmente, segundo MATIAS *et al.*, (1999) em ratos, o ácido ocadáico, quando administrado oralmente, pode ser encontrado, através de cromatografia líquida, em vários órgãos como cérebro, pulmão,

baço, coração, fígado, rim, estômago, tecidos do intestino, conteúdo do intestino, músculo, pele e urina.

Os resultados das análises físico-químicas e biológicas, das águas de coleta e manutenção quanto ao pH, Turbidez, condutividade, salinidade, estão dentro dos limites estabelecidos pela resolução Conama 20/86, para todas as amostras analisadas (ANEXO 5).

O resultado de colimetria, observado na Ilha de Ratonés foi de 23/100 ml de coliformes fecais e totais. Segundo GONÇALVES & SOUZA (1997), os coliformes encontrados em águas para uso de criação natural e/ou intensiva de espécies destinadas à alimentação humana, que poderão ser ingeridas cruas, não devem exceder a uma concentração média de 14/100ml ou, pelo menos, 10% das amostras não pode exceder a 43/100ml. No entanto, à resolução CONAMA, diz que os níveis aceitáveis são de 5.000/100ml para coliformes totais e de 1000/100ml para coliformes fecais (ANEXO 5). Isto mostra que a quantidade de coliformes fecais e totais, da água coletada na Ilha de Ratonés está dentro dos limites estabelecidos pelo CONAMA.

A partir dos resultados obtidos com a verificação da quantidade de cloretos existente nas amostras, observou-se que amostra do LCMM, é menor que a quantidade de cloretos encontrado na água coletada na Ilha de Ratonés. Suspeita-se que este resultado poderia estar sendo influenciado pelo processo de filtração que é realizado nesta água no LCMM, na tentativa de solucionar esta dúvida, coletou-se água neste laboratório, depois de filtrada e esterilizada. Verificou-se uma salinidade de 35ppm, mostrando, portanto, que este tipo de filtração não retira os sais existentes. Além disso, segundo FERREIRA & MAGALHÃES (1997), o mexilhão não sobrevive em salinidade

menores do que 19% e maiores do que 49 %, sendo a sua faixa ótima entre 34 e 36 %. Na repetição das análises, os resultados se mantiveram, o que impossibilitou a explicação do porquê dessa baixa quantidade de cloretos nessa amostra.

Os resultados para nitrato estão dentro dos limites estabelecidos pelo CONAMA, para as duas amostras analisadas (ANEXO 5).

Quanto aos sulfatos, a amostra coletada na Ilha de Ratonés apresentou uma concentração bem maior do que a encontrada no LCMM. Este limite não está estabelecido na resolução CONAMA para águas de classe 5. No entanto, esta quantidade de sulfato encontrada na Ilha de Ratonés deve ser, provavelmente, proveniente dos manguezais, onde a demanda de matéria orgânica é grande fazendo com que a quantidade de compostos sulfurados seja também abundante e sabe-se que esses compostos, transformam-se em sulfatos.

Os resultados da análise de carbono orgânico total mostram que a quantidade de matéria orgânica encontrada na Ilha de Ratonés é quase o dobro em relação a água do LCMM. Isto provavelmente se deve ao aumento da demanda de matéria orgânica vinda do continente e dos mangues. Como a ilha se localiza em uma baía de maneira que a circulação da água é mais lenta do que em mar aberto, a matéria orgânica tende a permanecer por mais tempo no local.

Diante dos resultados aqui obtidos, fica claro que tanto o AO puro, como os dinoflagelados produtores de AO, induzem a formação de micronúcleos em hemócitos de mexilhões, ou seja, são genotóxicos. E ainda, diante das ressalvas de DEPLEDGE (1998) que as exposições dos organismos à substâncias genotóxicas podem ter consequências nocivas e muitas vezes irreversíveis para os organismos tais como mutações letais,

desenvolvimento anormais, morte dos embriões, neoplasias, mudanças nas expressões dos genes que afetam a taxa de crescimento, rendimento reprodutivo e viabilidade da prole, entre outras. Chama-se a atenção para a necessidade de uma maior monitorização ambiental e maiores estudos dirigidos não só para o efeito nos animais aquáticos filtradores, como nos outros organismos que se alimentam destes.

Concordamos com as recomendações de JHA (1998) de que os estudos sobre o impacto de exposição à genotoxinas, em organismos aquáticos, deveriam não somente cobrir nossas tentativas de elucidar os mecanismos que envolvam mudanças direta no material genético, mas também efeitos epigenéticos e mudanças do pool gênico das populações.

Temos hoje em dia, clareza da necessidade de proteção ambiental. Além disso, sabemos que os mexilhões possuem considerável importância econômica em todo o litoral de nosso estado. Em vista disso, torna-se imperativo que avaliações como as realizadas neste estudo, juntamente com outros tipos de metodologias, sejam realizadas rotineiramente para a detecção precoce de genotóxicos no ambiente marinho. O conhecimento dos efeitos dessas toxinas, juntamente com a crescente produção de moluscos em nosso estado, realça a necessidade de um controle eficiente da qualidade sanitária dos mexilhões, baseado em um “Programa de Controle de Eflorescências de Algas Tóxicas”, com o objetivo de proteção do ambiente marinho e de reduzir os riscos de grandes intoxicações agudas e também os efeitos crônicos em populações.

VII. CONCLUSÕES

Os resultados aqui obtidos permitem concluir que, nas condições experimentais descritas:

1. A exposição de mexilhões ao AO puro, na concentração e tempo de exposição aqui empregado, causa aumento da frequência de hemócitos micronucleados
2. A maior frequência de hemócitos micronucleados nas primeiras 24 horas de exposição ao AO puro, mostra que o mesmo é rapidamente metabolizado e que os hemócitos neste período já passaram por pelo menos uma divisão celular.
3. Uma concentração de 200 células de *Prorocentrum lima* já é suficiente para induzir o aumento da frequência de hemócitos micronucleados.
4. O aumento do consumo do oxigênio parece não ter relação com a indução de micronúcleo.

ANEXO 1

Frequência de hemócitos micronucleados em mexilhões *Perna perna* expostos ao ácido ocadáico, Solvente e água do mar.

Tratamentos	Períodos	animal	Hemócitos		
			Analizados	micronucleados	% micronucleados
AO	24 horas	mexilhão1	2000	22	11
		mexilhão2	2000	29	14,5
		mexilhão3	2000	29	14,5
		mexilhão4	2000	10	5,0
		mexilhão5	2000	29	14,5
		mexilhão6	2000	23	11,5
	Média e DP			23,66 ±7,42	11,83 ±3,71
	48 horas	mexilhão7	2000	21	12,5
		mexilhão8	2000	20	9,5
		mexilhão9	2000	15	7,5
		mexilhão10	2000	24	5,0
		mexilhão11	2000	02	14,5
		mexilhão12	2000	13	11,5
	Média e DP			15,83 ±77,88	7,91 ±3,94
	72 horas	mexilhão13	2000	24	12,0
		mexilhão14	2000	16	1,0
		mexilhão15	2000	15	6,5
		mexilhão16	2000	10	5,0
		mexilhão17	2000	26	13,0
		mexilhão18	2000	10	5,0
	Média e DP			17,0 ±7,04	8,5 ±3,52
Média e DP				18,33±7,85	9,5±3,91
Etanol+Água (Solvente)	24 horas	mexilhão1	2000	21	10,5
		mexilhão2	2000	05	2,5
		mexilhão3	2000	04	2,0
		mexilhão4	2000	01	5,5
		mexilhão5	2000	01	4,0
		mexilhão6	2000	15	3,5
	Média e DP			7,83±8,25	3,91±4,12
	48 horas	mexilhão7	2000	11	3,5
		mexilhão8	2000	08	3,5
		mexilhão9	2000	07	2,0
		mexilhão10	2000	12	0,5
		mexilhão11	2000	03	0,5
		mexilhão12	2000	03	7,5
	Média e DP			7,33±3,82	3,66±1,91
	72 horas	mexilhão13	2000	12	6,0
		mexilhão14	2000	10	1,5
		mexilhão15	2000	08	1,5
		mexilhão16	2000	07	1,0
		mexilhão17	2000	07	5,0
		mexilhão18	2000	04	4,0
	Média e DP			6,33±2,87	3,16±1,43
Média e DP				7,16±5,21	3,58±2,60
Água do Mar	24 horas	mexilhão1	2000	03	1,5
		mexilhão2	2000	05	2,5
		mexilhão3	2000	02	1,0
		mexilhão4	2000	13	5,0
		mexilhão5	2000	08	4,5
		mexilhão6	2000	02	2,5
	Média e DP			5,54±4,32	2,75±2,16
	48 horas	mexilhão7	2000	10	3,5
		mexilhão8	2000	09	11,0
		mexilhão9	2000	05	3,0
		mexilhão10	2000	08	6,5
		mexilhão11	2000	03	4,0
		mexilhão12	2000	04	1,0
	Média e DP			6,5±2,88	3,25±1,44
	72 horas	mexilhão13	2000	07	4,0
		mexilhão14	2000	22	1,5
		mexilhão15	2000	06	2,0
		mexilhão16	2000	09	4,5
		mexilhão17	2000	03	1,5
		mexilhão18	2000	06	3,0
	Média e DP			8,83±6,73	4,4±3,36
Média e DP				6,94±4,83	3,47±2,41

ANEXO 2

Frequência de hemócitos micronucleados em mexilhões *Perna perna* alimentados com diferentes concentrações de *Prorocentrum lima* e grupo controle.

Tratamentos	animal	Períodos	Hemócitos		
			Total	micronucleados	% micronucleados
200 cels/animal	mexilhão1	24 horas	2000	32	16
	mexilhão2		2000	02	01
	mexilhão3		2000	04	02
	mexilhão4		2000	11	5,5
	mexilhão5		2000	09	4,5
	mexilhão6		2000	06	3,0
	Média e DP			10,66±10,94	5,33±5,47
	mexilhão7	48 horas	2000	11	5,5
	mexilhão8		2000	26	13
	mexilhão9		2000	06	3,0
	mexilhão10		2000	03	1,5
	mexilhão11		2000	08	4,0
	mexilhão12		2000	09	4,5
	Média e DP			10,5±8,06	5,25±4,03
	Média ±DP			10,58±9,16	5,29±4,58
1000 cels/animal	mexilhão1	24 horas	2000	01	0,5
	mexilhão2		2000	18	9,0
	mexilhão3		2000	13	7,5
	mexilhão4		2000	01	0,5
	mexilhão5		2000	27	13,5
	mexilhão6		2000	08	4,0
	Média e DP			11,33±10,17	5,83±5,13
	mexilhão7	48 horas	2000	05	2,5
	mexilhão8		2000	12	6,0
	mexilhão9		2000	04	2,0
	mexilhão10		2000	01	0,5
	mexilhão11		2000	11	5,5
	mexilhão12		2000	04	2,0
	Média e DP			6,16±4,35	3,08±2,17
	Média ±DP			8,75±7,93	4,37±3,96
10.000 cels/animal	mexilhão1	24 horas	2000	02	1,0
	mexilhão2		2000	02	1,0
	mexilhão3		2000	01	0,5
	mexilhão4		2000	03	1,5
	mexilhão5		2000	03	1,5
	mexilhão6		2000	04	2,0
	Média e DP			2,5±1,04	1,25±0,52
	mexilhão7	48 horas	2000	05	2,5
	mexilhão8		2000	07	3,5
	mexilhão9		2000	05	2,5
	mexilhão10		2000	04	2,0
	mexilhão11		2000	08	4,0
	mexilhão12		2000	09	4,5
	Média e DP			6,33±1,96	3,16±0,98
	Média ±DP			4,41±2,50	2,20±1,25
Controle	mexilhão1	24 horas	2000	03	1,5
	mexilhão2		2000	02	1,0
	mexilhão3		2000	01	0,5
	mexilhão4		2000	01	0,5
	mexilhão5		2000	13	6,5
	mexilhão6		2000	02	1,0
	Média e DP			3,66±4,63	1,83±2,31
	mexilhão7	48 horas	2000	02	1,0
	mexilhão8		2000	02	1,0
	mexilhão9		2000	01	0,5
	mexilhão10		2000	00	0
	mexilhão11		2000	02	1,0
	mexilhão12		AM	x	x
	Média e DP			1,04±0,89	0,7±0,44
	Média ±DP			2,90±3,70	1,45±1,85

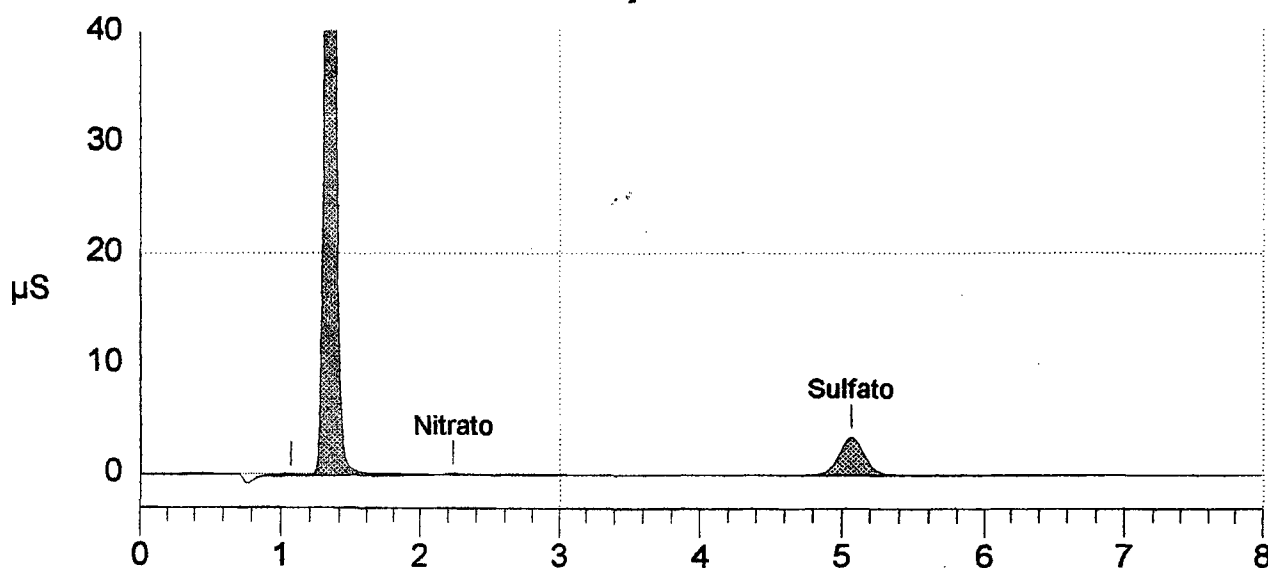
AM - Animal Morreu , DP - Desvio Padrão

ANEXO 3

Resultados das análises de cloreto, nitrato e sulfato obtidas através de cromatografia iônica.

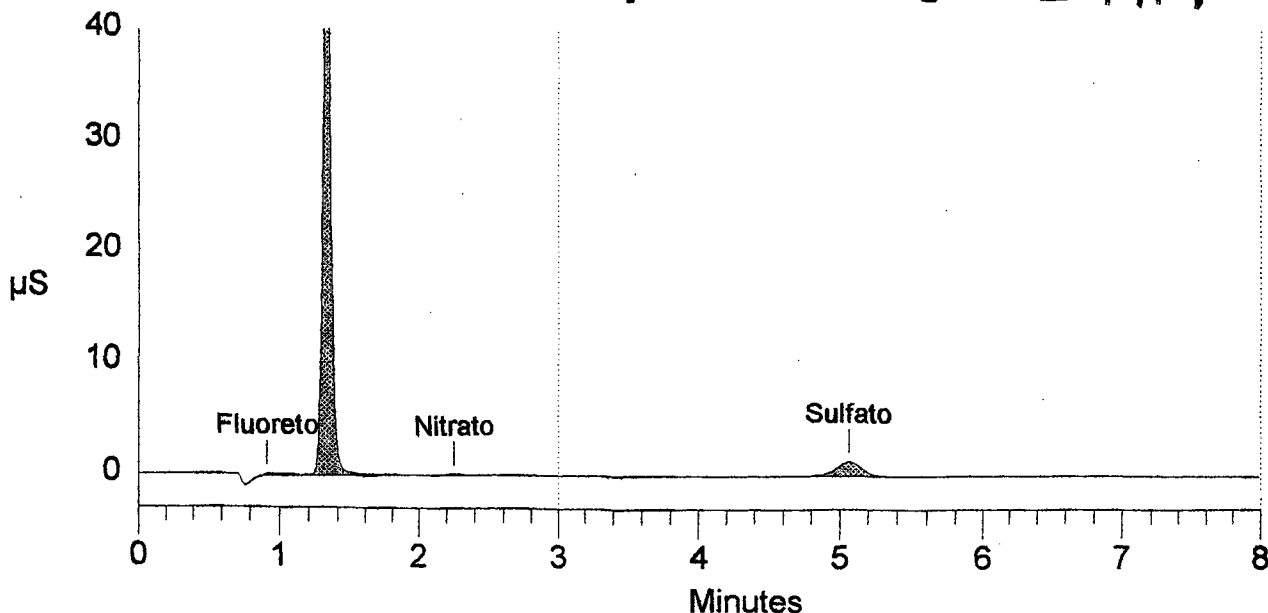
1.33 Cloreto	41.484	1001705	4764251	2	0.00
2.23 Nitrato	0.101	1135	7516	2	0.00
5.07 Sulfato	5.850	34087	416525	1	0.00
<hr/>					
Totals	47.436	1036926	5188292		

File: DATW7002.DXD Sample Ilha de Ratores



0.92 Fluoreto	0.235	1750	15764	1	0.00
1.32 Cloreto	17.322	498651	1989312	1	0.00
2.25 Nitrato	0.030	424	2225	1	0.00
5.07 Sulfato	2.167	12537	154289	1	0.00
<hr/>					
Totals	19.754	513362	2161590		

File: DATW7001.DXD Sample Barra da Lagoa - LCMM



ANEXO 4

Resultados das análises de carbono orgânico total, obtidas através de um Analisador de Carbono Total.

DATE 08(AUG)-06-1999 14:20

LCNA Relatomes

```

SAMPLE# 73 TC
[x 5, 26µl, C# 4, #WASH 7, SP 0min]
# AREA ms/l C# µl RG
1 4586 25.48
2 4537 25.21
-----
MN 4561 25.34
SD 34 0.191
CV 0.75 %
COR CONC DIL 25.34 [x 1.0]
COR CONC INJ 25.34 [x 1.0]
    
```

DATE 08(AUG)-06-1999 14:27

```

SAMPLE# 73 IC
[x 5, 33µl, C# 6, #WASH 7, SP 0min]
# AREA ms/l C# µl RG
1 5181 22.02
2 5153 21.90
-----
MN 5167 21.96
SD 19 0.086
CV 0.38 %
COR CONC DIL 21.96 [x 1.0]
COR CONC INJ 21.96 [x 1.0]
    
```

SAMPLE# 73 TOC(TC-IC) 3.380 ms/l

DATE 08(AUG)-06-1999 14:57

*Baixa da Loggia
LCMM*

```

SAMPLE# 76 TC
[x 5, 26µl, C# 4, #WASH 7, SP 0min]
# AREA ms/l C# µl RG
1 4475 24.87
2 4504 25.03
-----
MN 4489 24.95
SD 20 0.113
CV 0.45 %
COR CONC DIL 24.95 [x 1.0]
COR CONC INJ 24.95 [x 1.0]
    
```

DATE 08(AUG)-06-1999 17:14

```

SAMPLE# 76 IC
[x 5, 33µl, C# 6, #WASH 7, SP 0min]
# AREA ms/l C# µl RG
1 5457 23.22
2 5424 23.07
+ 3 5416 23.04
-----
MN 5432 23.11
SD 21 0.094
CV 0.40 %
COR CONC DIL 23.11 [x 1.0]
COR CONC INJ 23.11 [x 1.0]
    
```

SAMPLE# 76 TOC(TC-IC) 1.840 ms/l

ANEXO 5

Resolução 20/86 - CONAMA

PARÂMETRO	CLASSIFICAÇÃO UNIDADE	CLASSE ESPECIAL ⁽¹⁶⁾	CLASSE 1	CLASSE 2	CLASSE 3	CLASSE 4	CLASSE 5 SALINAS	CLASSE 6 SALINAS	CLASSE 7 SALOBRAS	CLASSE 8 SALOBRAS	CLASSE 1	CLASSE 2
H.L.	-	-	6,0 - 9,0	6,0 - 9,0	6,0 - 9,0	6,0 - 9,0	6,5-8,5 ⁽¹⁴⁾	6,5-8,5 ⁽¹⁴⁾	6,5 - 8,5	5,0 - 9,0	-	-
OD	mg/L O ₂	-	≤6	≥5	≥4	≥2	≥6	≥4	≥5	≥3	-	≥5
BO	mg/L O ₂	-	≤3	≤5	≤10	-	≤5	≤10	≤5	-	-	≤5
QO	mg/L O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
turbidez	UNT	-	≤40	≤100	≤100	-	-	-	-	-	-	-
Sólidos Suspensos	ppm	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cor	mg/L Pt	-	Natural	≤75	≤75	-	-	-	-	-	-	-
fat. Flut. inclus. Esp. não Nat.	-	-	V.A.	V.A.	V.A.	V.A.	V.A.	V.A.	V.A.	V.A.	-	V.A.
Óleos e Graxas	-	-	V.A.	V.A.	V.A.	I.T.	V.A.	I.T.	V.A.	I.T.	-	V.A.
subst. comuniq. Gosto ou Odor	-	-	V.A.	V.A.	V.A.	N.O.	V.A.	V.A.	V.A.	V.A.	-	V.A.
Corantes Artificiais	-	-	V.A.	⁽¹⁵⁾	⁽¹⁵⁾	-	V.A.	V.A.	V.A.	V.A.	-	⁽¹⁵⁾
subst. formem Dep. Objetáveis	-	-	V.A.	V.A.	V.A.	V.A.	V.A.	V.A.	V.A.	V.A.	-	-
temperatura	°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Substâncias Potenc. Prejudiciais												
Alumínio	mg/L Al	-	0,1	0,1	0,1	-	1,5	-	-	-	-	-
Amônia	mg/L N	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	0,5
Amônia não Ionizável	mg/L NH ₃	-	0,02	0,02	-	-	0,4	-	0,4	-	-	-
Arsênio	mg/L As	-	0,05	0,05	0,05	-	0,05	-	0,05	-	-	0,1
Bário	mg/L Ba	-	1,0	1,0	1,0	-	1,0	-	-	-	-	1,0
Berílio	mg/L Be	-	0,1	0,1	0,1	-	1,5	-	-	-	-	-
Boro	mg/L B	-	0,75	0,75	0,75	-	5,0	-	-	-	-	-
Benzeno	mg/L	-	0,01	0,01	0,01	-	-	-	-	-	-	-
Benzo-a-Pireno	mg/L	-	0,00001	0,00001	0,00001	-	-	-	-	-	-	-
Cádmio	mg/L Cd	-	0,001	0,001	0,01	-	0,005	-	0,005	-	-	0,0
Cianetos	mg/L Cn	-	0,01	0,01	0,2	-	0,005	-	0,005	-	-	0,2
Chumbo	mg/L Pb	-	0,03	0,03	0,05	-	0,01	-	0,01	-	-	0,1
Cloretos	mg/L Cl	-	250	250	250	-	-	-	-	-	-	-
Cloro residual	mg/L Cl ₂	-	0,01	0,01	-	-	0,01	-	-	-	-	-
Cobalto	mg/L Co	-	0,2	0,2	0,2	-	-	-	-	-	-	-
Cobre	mg/L Cu	-	0,02	0,02	0,5	-	0,05	-	0,05	-	-	1,0
Cromo Hexavalente	mg/L Cr (VI)	-	0,05	0,05	0,05	-	0,05	-	0,05	-	-	-
Cromo Total	mg/L Cr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,00
Cromo Trivalente	mg/L Cr (III)	-	0,5	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-
1,1 Dicloroetano	mg/L	-	0,0003	0,0003	0,0003	-	-	-	-	-	-	-
1,2 Dicloroetano	mg/L	-	0,01	0,01	0,01	-	-	-	-	-	-	-
Estanho	mg/L Sn	-	2,0	2,0	2,0	-	2,0	-	-	-	-	2,0
Índice Fenol	mg/L C ₆ H ₅ OH	-	0,001	0,001	0,3	≤1,0	0,001	-	0,001	-	-	0,0
Ferro	mg/L Fe	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-
Ferro Solúvel	mg/L Fe	-	0,3	0,3	5,0	-	-	-	-	-	-	-
Fluoretos	mg/L F	-	1,4	1,4	1,4	-	1,4	-	1,4	-	-	-
Fosfato Total	mg/L P	-	0,025	0,025	0,025	-	-	-	-	-	-	-
Lítio	mg/L Li	-	2,5	2,5	2,5	-	-	-	-	-	-	-
Manganês	mg/L Mn	-	0,1	0,1	0,5	-	0,1	-	-	-	-	-
Mercurio	mg/L Hg	-	0,0002	0,0002	0,002	-	0,0001	-	0,0001	-	-	0,0
Níquel	mg/L Ni	-	0,025	0,025	0,025	-	0,1	-	0,1	-	-	-
Nitrato	mg/L N	-	10	10	10	-	10	-	-	-	-	10
Nitrito	mg/L N	-	1,0	1,0	1,0	-	1,0	-	-	-	-	1,0
Cádmio	mg/L Cd	-	0,001	0,001	0,01	-	0,005	-	0,005	-	-	0,01
Cianetos	mg/L Cn	-	0,01	0,01	0,2	-	0,005	-	0,005	-	-	0,2
Chumbo	mg/L Pb	-	0,03	0,03	0,05	-	0,01	-	0,01	-	-	0,1
Cloretos	mg/L Cl	-	250	250	250	-	-	-	-	-	-	-
Cloro residual	mg/L Cl ₂	-	0,01	0,01	-	-	0,01	-	-	-	-	-
Cobalto	mg/L Co	-	0,2	0,2	0,2	-	-	-	-	-	-	-
Cobre	mg/L Cu	-	0,02	0,02	0,5	-	0,05	-	0,05	-	-	1,0
Cromo Hexavalente	mg/L Cr (VI)	-	0,05	0,05	0,05	-	0,05	-	0,05	-	-	-
Cromo Total	mg/L Cr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,005
Cromo Trivalente	mg/L Cr (III)	-	0,5	0,5	0,5	-	-	-	-	-	-	-
Coliformes ⁽¹⁸⁾ Total	n°/100 ml	ausentes ⁽¹⁷⁾	1.000 ⁽¹⁸⁾	5.000 ⁽¹⁸⁾	20.000 ⁽¹⁸⁾	-	5.000 ⁽¹⁸⁾	20.000 ⁽¹⁸⁾	5.000 ⁽¹⁸⁾	20.000 ⁽¹⁸⁾	-	5.000
Coliformes ⁽¹⁸⁾ Fecal	n°/100ml	-	200	1.000	4.000	-	1.000	4.000	1.000	4.000	-	1.000

GLOSSÁRIO

Agentes Genotóxicos: agentes que atuam direta ou indiretamente sobre o DNA, produzindo efeitos detectáveis à concentrações subtóxicas

Agentes Clastogênicos: agentes que induzem a formação de fragmentos cromossômicos ou cromatídicos acêntricos.

Agentes Aneugênicos: agentes que agem no fuso mitótico e originam cromossomos que se atrasam na migração anafásica da divisão celular.

Agente Mutagênico: qualquer agente físico ou químico que causa mutação

Anáfase: fase da mitose ou da meiose na qual os cromossomos se deslocam do plano equatorial da célula para os pólos opostos, sob orientação centromérica.

Aneuploidia: qualquer número de cromossomos que não seja um múltiplo exato do número haplóide, como no caso de trissomia e monossomia.

Bioensaio: um estudo de laboratório usado para determinar a habilidade de uma substância de produzir um efeito particular

Câncer: um crescimento anormal e descontrolado de células, criando um tumor que pode invadir tecidos vizinhos e ainda expandir-se para órgãos distantes (metastases).

Carcinogênese: o processo pelo qual uma substância é capaz de causar câncer

Células Somáticas: todas as células de um organismo, exceto as células da linhagem germinativa.

Células Germinativas: células com capacidade de reprodução com função reprodutiva. Nos animais são as células responsáveis pela formação dos gametas.

Centrômero: constrição primária ao longo do cromossomo, região na qual as cromátides-irmãs são mantidas.

Cromátides: são dois filamentos paralelos unidos pelo centrômero, que constituem um cromossomo de uma célula em divisão.

Cromátides irmãs: cada uma das cromátides do par, obtidas pela duplicação de um mesmo cromossomo parental

Cromossomo: é a unidade do genoma constituída de dna e proteínas, visível como entidade morfológica somente durante a divisão celular.

Cromossomo acêntrico: cromossomo desprovido de centrômero. Tais cromossomos não fazem, em nenhum caso, parte do complemento normal e permanente de um organismo, mas podem se formar acidentalmente como consequência de danos provocados por agentes mutagênicos

DNA: ácido desoxirribonucléico. Molécula que codifica os genes responsáveis pela estrutura e função dos organismos vivos, e permite a transmissão de informações genéticas de geração a geração.

DL₅₀: dose letal a 50%. a dose calculada de uma substância na qual ocorre a morte em 50% dos indivíduos testados

Divisão Celular: divisão de uma célula em duas células filhas, por mitose ou meiose.

Ecogenotoxicologia: se preocupa principalmente com os problemas que os danos genéticos induzidos podem trazer para a manutenção da integridade do ecossistema, da qual dependem a sobrevivência e reprodução das populações.

Ecossistema: sistema ecológico que inclui todos os organismos em uma dada área (comunidade), interagindo com o ambiente físico.

Epigenético: processos pelo qual as modificações herdáveis na função do gene ocorrem, mas não devido as trocas na sequência de base do DNA do organismo.

Eutrofização: a eutrofização é um processo de aumento nos níveis de matéria orgânica das águas em função da maior disponibilidade de nutrientes

Fragmento Acêntrico: fragmento cromossômico desprovido de centrômero.

Frequência Gênica: é a frequência de um determinado gene em uma população.

Fuso acromático: microtúbulos intracelulares envolvidos na organização dos cromossomos na placa metafásica e sua segregação na anáfase.

Gametogênese: é o processo de formação de gametas.

Gene: é a herança física e funcional.. um gene é uma sequência ordenada de nucleotídeos localizados numa posição particular de um determinado cromossomo; consta de um segmento de dna que codifica a sequência de aminoácidos de uma determinada cadeia polipeptídica

Genoma: todo material genético no cromossomo de um determinado organismo; seu tamanho é geralmente dado pelo número total de pares de bases

Hemolinfa: humor que preenche os vasos e hemocelos (cavidades do corpo provenientes do celoma), nos invertebrados. possui algumas células correspondentes aos leucócitos dos animais mais desenvolvidos, mais é desprovida de hemácias.

Hemócitos: são as células presentes na hemolinfa dos mexilhões que tem função no sistema imunológico e são rapidamente acionados durante as reações de defesa.

Intérfase: a parte do ciclo celular entre duas mitoses sucessivas

Metáfase: estágio da mitose ou da meiose no qual os cromossomos atingem sua condensação máxima e estão alinhados no plano equatorial da célula, ligados às fibras do fuso acromático através dos centrômeros; estágio no qual os cromossomos são mais facilmente estudados.

Metilação do DNA: acréscimo de um resíduo metil a uma base citosina na molécula de DNA para formar 5-metilcitosina. Desempenha um papel importante mas incompletamente compreendido na expressão gênica.

Mitose: processo de divisão celular comum, resultando na formação de duas células geneticamente idênticas à célula-mãe.

Mutação: qualquer alteração que ocorre no material genético de uma célula (danos no dna resultando em alterações genéticas).

Mutágeno: uma substância que causa mutações

Mutagênese: o processo pelo qual uma substância lesa o DNA e produz alterações ou perdas de genes ou cromossomos.

Núcleo: o núcleo é o centro de controle da célula. contém os cromossomos que, por sua vez são os locais onde ficam situadas centenas de milhares de moléculas de ácido desoxirribonucléico que formam os genes.

Organismos Bênticos: termo coletivo para formas de vida marinha que vivem fixos no fundo do oceano

Pool Gênico: todos os genes presentes num dado locus na população.

Síndrome: um padrão global típico de anomalias, suspostamente relacionadas quanto à etiologia.

Sistema Hematopoiético: formação dos glóbulos sanguíneos

Telófase: estágio na mitose e na meiose que se inicia quando os cromossomos-filhos chegam aos pólos da célula em divisão e termina quando as duas células filhas adquirem o aspecto de células em intérfase.

Teratogênese: o processo pelo qual uma substância produz e aumenta a frequência de malformações congênitas.

Toxicologia: o estudo de interações perigosas de químicos com organismos vivos e sistemas biológicos

Toxicidade Genética: efeitos tóxicos que resultam em danos para o DNA e alteram a expressão genética

Toxina: uma proteína específica produzida por certas plantas, animais e microorganismos que são altamente tóxicos para outros organismos

Tumor: um descontrolado e progressivo crescimento de células, podendo ser benigno ou maligno

Tumorigênico: agente capaz de causar tumor, tanto benigno como maligno.

Valor Adaptativo: a contribuição média de um alelo ou genótipo para a próxima geração ou para as gerações seguintes, comparada com aquela de outros alelos ou genótipos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, J.M.S. O teste do micronúcleo: seu uso no Homem. **Biotemas**, v. 6, n. 2, p. 1-19, 1993.
- AGOSTINI, J.M.S. Chromosome damage in underground coal miners: detection by conventional cytogenetic techniques and by submitting lymphocytes of unexposed individuals to plasma from at-risk groups. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 4, p. 641-646, 1996.
- AGUILERA, A.; GONZALEZ-GIL, S.; COSTAS, E. and LÓPEZ-RODAS, V. The biological function of okadaic acid in dinoflagellates: A specific mitogenic factor of *Prorocentrum lima*. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v.32, n.1, p. 37-44, 1997.
- ANDERSON, D. Eaux colorées et phytoplancton toxique. **Pour la Science**, v. 204, p. 68-76, 1994.
- ANDRÉU, B. El cultivo del mejillon en Europa. III factores relativos a la production. **Inst. Inv. Pesq.**, v. 5, p. 37-46, 1976.
- AONUMA, S.; USHIJIMA, T.; NAKAYASU, M.; SHIMA, H.; SUGIMURA, T and NAGAU, M. Mutation induction by okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, in CHL cells, but not in *S. typhimurium*. **Mutation Research**, v. 250, p. 375-381, 1991.
- AU, W.W.; SIERRA-TORRES, C.H.; CAJAS-SALAZAR, N.; SHIPP, B.K. and LEGATOR, M.S. Cytogenetic Effects from Exposure to Mixed Pesticides and the Influence from Genetic Susceptibility. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 6, 1999.
- AUBERT, M. Mer et littoral couple à risque. **In: Actes du Colloque, Biarritz.**, p. 198, 1987.
- AUBERT, M. Mediators of microbiological origin and eutrophication phenomena. **Marine Pollution Bulletin**, v. 21, p. 24 - 29, 1990.
- BAHARI, I.B.; NOOR, F.M. and DAUD, N.M. Micronucleated erythrocytes an assay to asses actions by physical an chemical genotoxic agents in *Clarias gaiepinus*. **Mutation Research**, v. 313, p. 1-5, 1994.

- BARRACCO, M.A.; STEIL, A.A. and GARGIONI, R. Morphological characterization of the haemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. **Mem. Int. Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 73-83, 1993.
- BAYNE, B.L. **Marine Mussel: Their Ecology and Physiology**. Cambridge. Univ. Press Cambridge. *Interm. Biol. Program.*, v.10, 1976.
- BAYNE, B.L. Measuring the biological effects of pollution: the mussel watch approach. **Wat. Sci. Tech.**, v. 21, p. 1089 - 1100, 1989.
- BELIN, C.; BERTHOME, J.P. and LASSUS, P. Dinoflagellés toxiques et phénomènes deaux colorées sur les côtes françaises: évolution et tendances entre 1975 et 1988. **Equinoxe**, v.25, p. 30-38, 1989.
- BERTHOME, J.P.; BELIN, C. and LASSUS, P. Eaux colorées, plancton toxiques et cultures marine. **Equinoxe**, v. 5, p. 9-16, 1985.
- BIALOJAN, C. & TAKAI, A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases: specificity and kinetics. **Biochem.**, v. 256, p. 283-290, 1988.
- BONI, L.; MANCINI, L.; MILANDRI, A.; POMPEI, M. and VIVIANI, R. First cases of DSP in the northern Adriatic Sea. **International Conference Regione Emilia Romagna**. Bologna - Italy, 21 a 24 March, 1990.
- BOTANA, L.M.; RODRIGUES-VIEYTES, M.; ALFONSO, A. AND LOUZAO, C.M. **Phycotoxins:Paralytic Shellfish Poisoning and Diarrhetic Shellfish Poisoning**. *HandBook of Food Analysis*, vol.2. edit by - Leo M.L. Nollet, 1996.
- BRICELJ, J.V.M.; LEE, J.H. and CEMBELLA, A.D. Growth of the blue mussel *Mytilus edulis* on toxic *Alexandrium fundyense* and effects of gut passage on dinoflagellate cells. IN: SMAYDA and SHIMIZU (eds.). **Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea**. Elsevier Science. New York, p. 371-376, 1993.
- BRUNETTI, R.; GABRIELE, M.; VALERIO, P. and GOLA, F. The micronucleus test: temporal pattern of baseline frequency in *Mytilus galloprovincialis*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 83, p. 75-78, 1992.
- BRUSICK, D. **Principles of genetic toxicology**. 2 ed. New York: Plenum Press, 1987.
- BUENO, A.M.S.; AGOSTINI, J.M.S.; SILVA, C.R.; KELLERMANN, S.D.; PIRES, R.C.A.; SBALQUEIRO, I. ; OGLIARI, P. and NITTA, H. Frequency of chromosomal aberration (CA) and micronuclei (MN) in *Akodon montensis* (Rodentia-Cricetidae) from rice field in Timbó, SC, Brasil. **Anais do II Congresso Latino Americano de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental**. Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico, 304 p. 1994.

- BUENO, A.M.S. **Utilização de roedores silvestres no biomonitoramento citogenético *in situ***. São Paulo, Tese de Doutorado, 1997.
- BURGEOT, T.; HIS, E. and GALGANI, F. The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. **Mutation Research**, v. 342, p. 125-140, 1995.
- BURGEOT, T.; WOLL, S. and GALGANI, F. Evaluation of micronucleus test on *Mytilus galloprovincialis* for monitoring applications along French Coasts. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, n. 1, p. 39-46, 1996.
- CANDEO, P.; FAVARON, M.; LENGYEL, I.; MANEV, R. M.; RIMLAD, J. M. and MANEV, H. Pathological phosphorylation cause neural death: effect of okadaic acid in primary culture of cerebellar granule cells. **J. Neurochem.**, v. 59, p. 1558-1561, 1992.
- CANOVA, S.; DEGAN, P.; PETERS, L.D.; LIVINGSTONE, D.R.; VOLTAN, R. and VENIER, P. Tissue dose, DNA adducts, oxidative DNA damage and CYP1A - immunopositive proteins in mussel exposed to waterborne benzo[a]pyrene. **Mutation Research**, v. 399, p. 17-30, 1998.
- CARDOSO, L.S. **Dinoflagelados da Ilha do Arvoredo e da Praia de Ponta das Canas - SC - Brasil (setembro de 1991 a fevereiro de 1992): Considerações taxonômicas e Ecológicas**. Porto Alegre, Dissertação de Mestrado, 1993.
- CARLSON, R.D. & TINDALL, D.R. **Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Islands**. Elsevier Science, New York, p. 171-176, 1985.
- CARMODY, E.P.; JAMES, K.J. and KELLY, S.S. Dinophysistoxin-2: The predominant diarrhoetic shellfish toxin in Ireland. **Toxicon**, v. 34, p. 351-359, 1996.
- CARRANO, A.V. & NATARAJAN, A.T. Considerations for populations monitoring using cytogenetic techniques. **Mutation Research**, v. 204, p. 379-406, 1988.
- CSGMT (Colaborative Study Group for the Micronucleus Test) Protocol recommended by the CSGMT/JEMS. MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. **Mutagenesis**, v. 10, n.3, p. 153-159, 1995.
- CHEN, D.Z.X.; BOLAND, M.P.; SMILLIE, M.A.; ANDERSEN, R.J. and HOLMES, C.F.B. Identification of protein phosphatase inhibitors of the microcystin class in the marine environment. **Toxicon**, v. 31, p. 1407-1414, 1993.
- CHENG, T.C. Bivalves. In: RATCLIFFE, N.A.; ROWLEY, A.F. (eds) *Invertebrate blood cells*, London: Academic Press, v. 1, p. 233-295, 1981.

- CHIPMAN, J.K. & MARSCH, J.W. Bio-techniques for detection of genetic toxicity in the aquatic environment. **J. Biotechnol.**, v. 17, p. 199-208, 1991.
- COHEN, P. The structure and regulation of protein phosphatases. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 453-508, 1989.
- CORTÉS-ALTAMIRO, R.; HERNANDEZ-BECERRIL, D.U. and LUNA-SORIA, R. Mareas rojas en Mexico: una revision. **Rev.Lat.-Amer. Microbiol.**, v.37, p. 343-352, 1995.
- DASH, S.; PANDA, K.K. and PANDA, B.B. Biomonitoring of low levels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay. **Mutation Research.**, v. 203, p. 11-21, 1988.
- DE FLORA, S.; BAGNASCO, M. and ZANACCHI, P. Genotoxic, carcinogenic and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. **Mutation Research**, v. 258, p. 285-320, 1991.
- DEPLEDGE, M.H. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. **Mutation Research**, v. 399, p. 109-122, 1998.
- DICKEY, R.W.; BOBZIN, S.C.; FAULKNER, D.J.; BENCSATH, F.A. and ANDRZEJEWSKI, D. Identification of okadaic acid from a caribbean dinoflagellate, *Prorocentrum concavum*. **Toxicon**, v. 28, p. 371-377, 1990.
- DODGE, J.D. Revision of the Taxonomy within the genus *Prorocentrum*. **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 71, p. 102-105, 1975.
- DRAISCI, R.; LUCENTINE, L.; GIANNETTI, L.; BORIA, P. and STACCHINI, A. Detection of diarrhetic shellfish toxins in mussels from Italy by ionspray liquid chromatography-mass spectrometry. **Toxicon**, v. 33, p. 1591-1603, 1995.
- DURAND-CLEMENT, M.; CLEMENT, J.C.; MOREAU, A.; JEANNE, N. and PUISEUX-DAO, S. New ecological and ultrastructural data on the Dinoflagellate *Dinophysis* species from de french coast. **Marine Biology**, v.97, p. 34-37, 1988.
- EVANS, H.J.; NEARLY, G.J. and TONKINSON, S.M. The use of colchicine as an indicator of mitotic rate in broad bean root meristems. **J. Genet.**, v. 55, p. 487-502, 1957.
- EVANS, J.H. Historical perspectives on the development of the *in vitro* micronucleus test: a personal view. **Mutation Research**, v. 392, p. 5-10, 1997.

- FAHRING, R.; LANG, R. and MADLE, S. General strategy for assessment of genotoxicity. **Mutation Research**, v.252, p.161-163, 1991.
- FAUST, M.A. Morphology of ciguatera-causing *Prorocentrum lima* (Pyrrophyta) from widely different sites. **J. Phycol.**, v.27, p. 642-648, 1991.
- FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v. 392, p. 11-18, 1997.
- FERNANDES, W.M. **Crescimento do mexilhão *Perna perna* (Bivalvia:Mytilidae) em sistema suspenso fixo na região de Santo Antônio de Lisboa, Ilha de Santa Catarina - SC.** Santa Catarina, Dissertação de Mestrado, 1992.
- FERNANDEZ, M.T.; ZITKO, V.; GASCON, S. and NOVELLI, A. The marine toxin okadaic acid is a potent neurotoxin for culture cerebellar neurons. **Life Sci.**, v. 49, p. 157-162, 1993.
- FERNANDEZ, M.T.; MIGUEZ, A.; CACHO, E. and MARTINEZ, A. Detection of okadaic acid esters in the hexane extracts of Spanish mussels. **Toxicon**, v. 34, p. 381-387, 1996.
- FERREIRA, J.F. & MAGALHÃES, A.R.M. **Desenvolvimento do Cultivo de mexilhões em Santa Catarina (sul do Brasil).** Resumos do VI Congresso Latinoamericano de Ciência do Mar (COLACMAR), Mar del Plata, Argentina, p. 80, 1995.
- FERREIRA, J.F. & MAGALHÃES, A.R.M. **Técnicas Básicas em Cultivo de Moluscos.** Apostila elaborada pelo Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos - UFSC, 1997.
- FERREIRA, J.F. & GRUMANN, A. Cultivo de Moluscos Marinhos em: **Tecnologia e inovação para a indústria: biotecnologia, novos materiais e tecnologia da informação.** Brasília, Co-edição SEBRAE, p.26-29, 1999.
- FESSARD, V.; GROSSE, Y.; PFHL-LESZKOWICZ, A. and PUISEX-DAO, S. Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes. **Mutation Research**, vol, 361, p. 133-141, 1996.
- FREITAS, J.C. Toxinas de algas fitoplanctônicas. **Manual de Métodos Ficológicos**, p. 311-327, 1995.
- FREUDENTHAL, A.R. & JIJINA, J.L. Potential hazards of Dinophysis to consumers and shellfisheries. **J. Shellfish Res.**, v. 7, p. 695-701, 1988.
- FUJIKI, H.; SUGANUMA, M.; SUGURI, H.; YOSHIZAWA, S.; OJIKI, M. and WAKATSA, K. Induction of ornithine decarboxylase activity in mouse skin by a possible tumor promoter, okadaic acid. **Proc. Jap. Acad. Ser.**, v. 63, p. 51-53, 1987.

- FUJIKI, H.; SUEOKA, E.; KOMORI, A. and SUGANUMA, M. Tumor promotion and TNF- α gene expression by the okadaic acid class tumor promoters. **Environ. Carcin. & Ecotox. Revs.**, v. 15:1, p. 1-40, 1997.
- GAGO-MARTINEZ, A.; VAZQUEZ-RODRIGUES, J.A.; THIBAUT, P. and QUILLIAM, M. Simultaneous occurrence of Diarrhetic and Paralytic Shellfish Poisoning Toxins in Spanish Mussels in 1993. **Natural Toxins**, v.4, p.72-79, 1996.
- GALLOWAY, S.M.; BENY, P.K. and NICHOLS, W.W. Chromosome aberrations in individuals occupationally exposed to ethylene oxide and in a larger control population. **Mutation Research**, v. 170, p. 55-74, 1996.
- GHOSH, S. & PAWELETZ, N. Localization of chromatin in "persistent" nucleoli in okadaic acid treated HeLa cells. **Cell Bioll. intern. Rep.**, v, 16, p, 475-480, 1992b.
- GONÇALVES, F.B & SOUZA, A.P. **Disposição Oceânica de Esgotos Sanitários: história, teoria e prática.** (Eds.) Gonçalves, F.B. e Souza, A.P. Rio de Janeiro: ABES, 1997.
- GOSLING, E. **The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture.** Developments in Aquaculture and Fisheries Science, v. 25, London : Elsevier Sci. Publ., 1992.
- HALLEGRAEF, G.M. A review of harmful algal bloom and their apparent global increase. **Phycologia**, v.33, n.2, p. 79-99, 1993.
- HARVEY, J.S. & PARRY, J.M The analysis of DNA adduct formation, removal and persistence in the common mussel *Mytilus edulis* exposed to 4-nitroquinoline 1-oxide. **Mutation Research**, v. 399, p. 31-42, 1998.
- HEDLLE, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, p. 187-190, 1973
- HEDLLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MAC GREGOR, J.T and SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A Report of U.S. Environmental Protection Agency Gerle-Tox Program. **Mutation Research**, v. 123, p. 61-188, 1983.
- HERNANDEZ-BECERRIL, D.U. Fitoplancton marino en Mexico. **Rev. Lat.-Amer. Microbiol.**, v.29, p. 171-174, 1987.

- HOGSTEDT, B. Micronuclei in lymphocytes with preserve cytoplasm. A method for assessment of cytogenetic damage in man. **Mutation Research**, v. 130, p. 63-72, 1984.
- HONKANEN, R.E.; CODISPOTI, B.A.; TSE, K. and BOYNTON, A.L Characterisation of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. **Toxicon**, v. 32, p. 339-350, 1994.
- HUTCHINSON, T.H.; JHA, A.N.; MACKAY, J.M.; ELLIOTT, B.M. and DIXON, D.R. Assessment of developmental affects, cytotoxicity and genotoxicity in the marine polychaete (*Platynereis dumerilli*) exposed to disinfected municipal sewage effluent. **Mutation Research**, v. 399, p. 97-108, 1998.
- ISHIDA, Y; FURUKAWA, Y.; DECAPRIO, J. A.; SAITO, M and GRIFFING, M. Treatment of myeloid leukemic cells with the phosphatase inhibitor okadaic acid induces cell cycle arrest at ether G / S or G / M depending on dose. **J. Cell Physiol.**, v. 150, p. 484-492.1992.
- JACKSON, A.E.; MARR, J.C. and McLACHLAN, J.L. The prodution of diarrhetic shellfish toxins by an isolate of *Prorocentrum lima* from Nova Scotia, Canada. In: Smayda, T.J. and Shimitzu, Y. (eds): **Toxic Phytoplankton in the sea**. Elsevier Science, New York, p. 513-518, 1993.
- JACQUES, M.; HOSE, J.E and GUILLETE, L.J. The micronucleus assay in the *Zebra musse* to in situ monitor genotoxicity in freswater environments. **Mutagenesis**, v. 393, p. 21-29, 1996.
- JANERI, I.B.G. **Observação de micronúcleos em células do mexilhão Perna perna (Linné 1758)**. Santa Catarina. Trabalho de conclusão de curso apresentado para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas, 1996.
- JANERI, I.B.G. **Variação da Frequência de Hemócitos Micronucleados em Mexilhão Perna perna em Função do Estágio do Ciclo Sexual e Caracterização de outras Anormalidades Nucleares**. Universidade Federal de Santa Catarina .Dissertação de Mestrado, 1999.
- JHA, A.N. Use of aquatic invertebrates in genotoxicological studies. **Mutation Research**, v. 399, p. 1-2, 1998.
- KELLER, M.D. & GUILLARD, R.R.L. Media for the Culture of ocanic ultraphytoplankton. **J. Phycol.**, v. 23, p. 633-638, 1985.

- KUHNEN, S.; BUENO, A.M.S.; FERREIRA, J.F. and AGOSTINI, J.M.S. **Padronização do teste do micronúcleo em hemócitos do mexilhão *Perna perna***. Resumos do 43º Congresso Nacional de Genética, Goiânia, Brasil, p. 118, 1997.
- KUMAGAI, M.; YANAGI, T.; MURATA, M.; YASUMOTO, Y.; KAT, M.; LASSUS, P. and RODRIGUEZ - VASQUEZ. Okadaic acid as the causative toxin of diarrhetic shellfish poisoning in Europe. **Agric. Biol. Chem.**, v. 50, p. 2853-2857, 1986.
- KUME, H.; TAKAI, A.; TOKUNO, H. and TOMITA, T. Regulation of Ca^{2+} - dependent K^{+} channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. **Nature**, v. 341, p. 152-154, 1989.
- KURELEC, B. The genotoxic disease syndrome. **Mar. Environ. Res.**, v. 35, p. 341-348, 1993.
- LAABIR, M. & GENTIEN, P. Survival of Toxic Dinoflagellate after gut passage in the Pacific Oyster. *Crassostrea gigas*. Thunburg. **Journal of Shellfish Research**, v. 18, n. 1, p. 217-222, 1999.
- LASSUS, P. Intoxications par les coquillages: une nette recrudescence. **Le Généraliste**, v. 548, p. 22-23, 1983.
- LASSUS, P. Plancton toxiques et plancton d'eaux rouges sur les côtes européennes. **IFREMER**, 111 pp, 1989.
- LASSUS, P.; HERBLAND, A. and LEBAUT, M.C. Toxic blooms and toxic effects along the French Coast. **World Aquaculture**, v. 22, p. 49-54, 1991.
- LAWRENCE, J.E.; BAUDER, A.G.; QUILLIAM, M.A. and CEMBELLA, A.D. *Prorocentrum lima*: A Putative Link to Diarrhetic Shellfish Poisoning in Nova Scotia, Canada. **Harmful Algae**. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission. UNESCO, 1998.
- LEE, J.S.; YANAGI, T.; KENMA, K. and YASUMOTO, T. Fluorometric determination of diarrhetic shellfish toxins by high-performance liquid chromatography. **Agric. Biol. Chem.**, v. 51, p. 877-881, 1987.
- LIVINGSTONE, D.R.; REED, R.D. and OLSON, B.L. Induction of nuclear aberrations by smokeless in epithelial cells of human oral mucosa. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 15, p. 136-144, 1990.
- LIVINGSTONE, D.R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **J. Chem. Tech. Biotechnol.**, v. 57, p. 195-211, 1993.

- LIU, Y.; ZHONG-LIANG, W. and CHEN, J.K. Differential effects of aneugens and clastogens on incidences of multinucleated cells and of micronucleate cells in Chinese hamster lung (V79) cell line in vitro. **Mutation Research**, v. 413, p. 39-45, 1998.
- LÓPEZ-BAREA, J. Biomarkers in ecotoxicology : an overview, In: DEGEN, G.H. (ed) *Toxicology in Transion. Eurotox proceedings.*, p. 57-79, 1995.
- LÓPEZ-BAREA, J. & PUEYO, C. Mutagen cotent and metabolic activation of promutagens by molluscs as biomarkers of marine pollution. **Mutation Research**, v. 399, p. 3-15, 1998.
- LUU, H.A.; CHEN, D.Z.X.; MAGOON, J.; WORNIS, J.; SMITH, J. and HOLMES, C.F.B. Quantification of diarrhetic shellfish toxins and identification of novel protein phosphatase inhibitors in marine phytoplankton and mussels. **Toxicon**, v. 31, p. 75-83, 1993.
- MACKAY, J.M. Dose selection *in vivo* toxicology assays. **Environ. Mol. Mut.**, v. 25, p. 323-327, 1996.
- MAGALHÃES, A.R.M. *Teor de proteínas do mexilhão Perna perna (Linné, 1758) (Mollusca, Bivalvia), em função do ciclo sexual.* São Paulo, Dissertação de Mestrado, 1985.
- MARGALEF, R. **Ecologia.** Ediciones Omega S.A., Barcelona. 951 p, 1974.
- MARR, J.C.; MCDOWELL, L.M. and QUILLIAM, M.A. Investigation of derivatization reagents for the analysis of DSP toxins by liquid chromatografy with fluorescence detection. **Natural Toxins**, v.2, p. 302-311, 1994.
- MASON, J. Mussel cultivation. **Underwater J.**, v. 3, p. 52-59, 1971.
- MATIAS, W. G, BONINI, M. and CREPPY, E.E. Inhibition of protein sythesis in a cell-free system and Vero cells by okadaic acid, a diarrhetic shellfish toxin. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 18, p. 61-72, 1996.
- MATIAS, W. G & CREPPY, E.E . Transplacental passage of [3H] okadaic acid in pregnant mice measured by radioactivity and performance liquid chromatografy. **Hum. Exp. Toxicol.**, v.15, p. 226-230, 1996a.
- MATIAS, W. G & CREPPY, E.E. Evidence for an enterohepatic circulation of okadaic acid in mice. **J. Toxic. Subst. Mechan.**, v, 15, p. 405-414, 1996b.
- MATIAS, W. G & CREPPY, E.E. 5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of ADN damage induced by okadaic acid in Vero cells. **Environmental Toxicology and Water Quality.**, v.13, p.83-88, 1998.

- MATIAS, W. G, TRAORE, A. and CREPPY, E.E. Variations in the distribution of okadaic acid in organs and biological fluids of mice related to diarrhoeic syndrome. **Human & Experimental Toxicology**, v 18 (5), p. 345-350, 1999.
- MATIAS, W.G.; TRAORE, A.; BONINI, M.; SANNI, A. and CREPPY, E.E. Oxygen reative radicals production in cell culture by okadaic acid and their implication in protein synthesis inhibition. **Human & Experimental Toxicology**, v. 18, p. 634-639, 1999a.
- MELLGREN, G.;VINTERMYR, O.K. BOE, R and DOSKELAND, S.O. Hepatocyte DNA republication is abolished by inhibitors selecting protein phosphatase 2A rather than phosphatase 1. **Exp. Cell Res.**, v, 205, p,293-301, 1993.
- MERSCH, J.; BEAUVAIS, N. and NAGEL, P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of *Zebra mussels, Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. **Mutation Research**, v. 371, p. 47-55, 1996.
- MÍGUEZ, A.; FERNANDEZ, M.L; CACHO, E. and MARTÍNEZ, A. Mouse Survival Time as a DSP Toxicity Criterion. In: **Harmful and Toxic Algal Blooms**, MÍGUEZ, A.; CACHO, E.; MARTÍNEZ, A. (eds.) (Intergovernmental Oceanografic Commission of UNESCO), p. 239-240, 1996.
- MITCHELMORE, C.L. and CHIPMAN, J.K. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. **Aquat. Toxicol in Press**, v. 9, p. 41-45,1998.
- MOORE, M.N. & LOWE, A.F. The citology and cytochemistry of the haemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected particles. **J. Invert. Pathol.**, v. 29, p. 18-30, 1977.
- MOORE, S.F. Molecular and cellular indices of pollutant effects. **Strategies and advanced techniques for marine pollution studies : Mediterranean Sea.**, v. 9, p. 41-435, 1986.
- MOREIRA, F.M. **Estudo Morfológico e Quantitativo dos Hemócitos do Mexilhão *Perna perna* (Mollusca:Bivalvia).**Santa Catarina, Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas, 1995.
- MOSLEN, M.T. & LEGATOR, M.S. Advantages of a combined testing protocol (CCTP) with multiple endpoints: the reverse tier approach. **Mutation Research**, v. 205, p. 91-97, 1988.

- MURAKAMI, Y.; OSHIMA, Y and YASUMOTO, T. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. **Bull Jpn. Soc. Sci. Fish.**, vol, 48, p. 69-72, 1982.
- NATARAJAN. A.T. & ZWANENBURG, T.S.B. Mechanisms for chromosomal aberrations in mammalian cells. **Mutation Research**, v. 95, p. 1-6, 1982.
- PARK, D.L. Detection of Ciguatera and Diarrhetic Shellfish Toxins in Finfish and Shellfish with Ciguatera kit. **Journal of AOAC International**, v.78:2, p. 533-537, 1995.
- PROENÇA, L.A., SCHMITT, F.; COSTA, T. and RÖRIG, L. Just a diarrhea? Evidences of diarrhetic shellfish poisoning in Santa Catarina - Brazil. **Ciência e Cultura**, v.50, n. 6, p. 458-462, 1998.
- REGUERA, J. BLANCO, M.L. FERNÁNDEZ, T. and WYATT, I. **Harmfull Algae**. Xunta de Galicia and IOC/UNESCO, Santiago de Compostela, p. 22-25, 1997.
- RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em células esfoliadas. In: **Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética/ Revista brasileira de Genética, 1991.
- RIEBER, M.S. & RIEBER, M. Accessibility to DNA in carcinoma chromatin is promoted by nanomolar okdaic acid: effect on AT-rich DNA binding proteins. **Cancer Res.**, v, 52, p. 6397-6399, 1992.
- ROGERS, C.G. & BOYES, B.G. Evaluation of the genotoxicity of domoic acid in a hepatocyte- mediated assay with V79 Chinese hamster lung cells. **Mutation Research**, v. 226 (3), p. 191-196, 1989.
- SCARPATO, R.; MIGLIORE, L. and BARALE, R. The micronucleus assay in *Anadonta cygnea* for the detection of drinking water mutagenicity. **Mutation Research**, v. 245, p. 231-237, 1990.
- SCHANTZ, E.J.; GHZAROSSIAN, V.E.; SCNOES, H.K. PREZZANITE, J.O. and CLARDY, J. The structure of saxitoxin. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 97, p. 1238-1239, 1975.
- SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 102, p. 89-102, 1975.
- SEED, R. & BROWN, R.A. A comparition of the reproductive cycles of *Modiolus modiolus* (L.), *Cerastoderma* (Cardium) edule (L.), and *Mytilus edulis* (L.) in Strandford Louger, Northern Ireland. **Ecologia**, v. 30, p. 173-181, 1977.

- SHENOLIKAR, S. & NAIRN, A.C. Protein phosphatases, recent progress. **Advan. Sec. Messen. Phosphopro**, v. 23, p. 1-99, 1991.
- SOURNIA, A.; BELIN, C.; BERLARD, B.; ERARD, C.; LEDEN, E. and GERTIER, P. Le phytoplancton nuisible des côtes de France de la biologie à la prévention. In: **Catologue des espèces et taxons infraspécifiques de dinoflagellés marins actuelles**. Ed. SOURNIA, C. Paris, 1991.
- STEIDINGER, K.A. A re-valuation of toxic Dinoflagellate Biology and Ecology, **Physiological Research**, v. 2, p. 147-188, 1983.
- STEIDINGER, K.A. Some Taxonomic and Biologic Aspects of Toxic Dinoflagellates, **Algal Toxins in Seafood and Drinking Water**, Academic Press Ltd, p. 1-139, 1993.
- STEINERT, S.A.; STEIB-MONTEE, R.; LEATHER, J.M. and CHADWICK, D.B. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. **Mutation Research**, v. 399, p. 65-85, 1998.
- SUEOKA, E. ; SUEOKA, N.; SUGANUMA, M. and FUJIKI, H. Carcinogenesis of okadaic acid class tumor promoters derived from marine natural. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 123, p. 413 - 419, 1997.
- SUGANUMA, M.; FUJIKI, H.; SUGURI, H.; YOSHIZAWA, S.; HIROTA, M. and SUGIMARA, T. Okadaic acid: An additional non-phorbol-12-tetradecanecarboxylate-13-acetate-type tumor promoter. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 58, p. 1768-1771, 1988.
- SUGANUMA, M.; FUJIKI, H.; OKABE, S.; NISHIWAKI, S. and ROSNER, M.R. Structurally different members of the okadaic acid class selectively inhibit protein serine/threonine but not tyrosine phosphatase activity. **Toxicon**, v. 30, p. 873-878, 1992.
- SUNDSTROM, B.; EDLER, L. and GRANELI, E. The global distribution of harmful effects of phytoplankton. In: **Toxic Marine Phytoplankton** Eds: GRANELI, E.; SUNDSTROM, B.; EDLER, L. and ANDERSON, D.M.. Elsevier, Amsterdam, p. 537-541, 1990.
- SWEENEY, B.M. Red Tides. **Nat. Hist.**, v. 85, p. 78-83, 1976.
- TACHIBANA, K.; SCHEUER, P.J.; TSUKITANI, Y.; KIKUCHI, H.; ENGEN, D.V.; CLARDY, J.; GOPICHAND, Y. and SCHMITZ, F.J. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *halichondria*. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 103, p. 2469-2471, 1981.

- TATES, A.D.; FARMER, P.B.; MOSSEL, H.; TANG, Y.S.; NATARAJAN, A.T. and EHRENBERG, L. Biological and chemical monitoring of occupational exposure to ethylene oxide. **Mutation Research**, v. 250, p. 483-497, 1980.
- TAYLOR, S.L. & SCANLAN, R.A. Food toxicology: a perspective on the relative risks. In: **12 th Basic Symposium Food Toxicology**. Eds: TAYLOR, S.L.; SCANLAN, R.A. Dekker, New Orleans, p.94, 1988.
- TOHDA, H., NAGAO, M.; SUGIMURA, T. and OIKAWA, A. Okadaic acid, a protein phosphatase inhibitor, induces sister-chromatid exchanges depending on the presence of bromodeoxyuridine. **Mutation Res.**, v, 289, p. 275-280, 1993.
- TOMMASI, L.R. A riqueza finita dos oceanos. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v.24:141, p. 6-9, 1998.
- TUBARO, A.; FLORIO, C.; SOSA, S.; LUXICH, E. and YASUMOTO, T. A protein phosphatase 2A inhibition assay for a fast and sensitive assessment of okadaic acid contamination in mussels. **Toxicon**, v.34, p. 734-752, 1996.
- TUCKER, J.D. & PRESTON, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. **Mutation Research**, v. 365, p. 147-159, 1996.
- VANPRAYS, P.; VERMEIREN, F.; SYSMANS, M. and TEMMERMAN, R. The micronucleus assay as a test for detection of aneugenic activities. **Mutation Research**, v. 244, p. 95-103, 1990.
- VENIER, P.; MARON, S. and CANOVA, S. Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo[a] pyrene. **Mutation Research**, v.390, p. 33-44, 1997.
- VIARENGO, A. & CANESI, L. Mussell as biological indicators of pollution. **Aquaculture**, v.94, p. 225-243, 1991.
- VIEYTES, M.R.; FONTAL, O.I.; LEIRA, F. and BOTANA, L.M. A fluorescent microplate assay for diarrhetic shellfish toxins. **Analytical Biochemistry**, v.248, p. 258-264, 1997.
- VOLTERA, L.; GUCCI, P.M.B. and BRUNO, M. Problemi tecnici connessi al fenomeno delle DSP (diarrhetic shellfish poisoning). **Ambiente Risorse Salute**, v. 5, p. 12-17, 1990.

- WATRAS, C. J., CHISHOLM, S.S. and ANDERSON, D. M. Regulation of growth in an estuarine clone of *Gonyaulax tamarensis* Lebour: salinity - dependent response. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 62, p. 25-37, 1982.
- WILSON, J.T.; PASCOE, P.L.; PARRY, J.M. and DIXON, D.R. Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca:Pelecypoda). **Mutation Research**, v. 399, p. 87-95, 1998.
- WRIGHT, J.L.C.; BOYD, R.K. and de FREITAS, A.S.W. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern PEI. **Can. J. Chem.**, v. 67, p. 481-485, 1989.
- WRISBERG, M.N. & VAN DER GAAG, M.A. *In vivo* detection of genotoxicity in waste water from a wheat and rye straw paper pulp factory. **The Science of the Total Environment**, v. 12, p. 95-108, 1992.
- WURGLER, F.E. & KRAMERS, P.G.N. Environmental effects of genotoxins (ecotoxigenotoxicology). **Mutagenesis**, v. 7, n. 5, p. 321-327, 1992.
- YAMASHITA, K.; YASUDA, H.; Pines, J.; YASUMOTO, K.; NISHITANI, H.; OHTSUBO, M.; HUNTER, T.; SUGIMURA, T. and NISHIMOTO, T. Okadaic acid, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases, activates cdc2 / H1 kinase and transiently induces a premature mitosis-like state in BHK21 cells. **EMBO J.**, v. 9, p. 4331-4338, 1990.
- YASUMOTO, T.; OSHIMA, Y. and YAMAGUCHI, M. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku District. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.**, v. 44, p. 1249-1255, 1978.
- YASUMOTO, T.; FUJIKI, M. SASAKI, K. and SUGIYAMA, K. Determinations of marine toxins in foods. **J. AOAC Int.**, v. 78, p. 574-582, 1980.
- YASUMOTO, T.; MURATA M.; OSHIMA, Y.; SANO, M.; MATSUMOTO, G. K and CLARDY, J. Diarrhetic shellfish toxins. **Tetrahedron**, v, 41, p. 1019-1025, 1985.
- YUASA, H., K. ; YOSHIDA, H. ; IWATA, H.; NAKANISHI, M.; SUGANUMA, H. and TATEMATSU, M. Increase of labelling indices in gastrointestinal mucosae of mice and rats by compounds of the okadaic acid type. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v, 120, p. 208-212., 1994.
- ZALESKI, J.; STEWARD, R.A. and SIKKA, H.C. Metabolism of benzo[a]pyrene and trans - benzo[a]pyrene - 7,8-dihydrodiol by freshly isolated hepatocytes from mirror carp. **Carcinogenesis**, v. 12(2), p. 167-174, 1991.

ZHENG, B.; CHAMBERS, T.C.; RAYNOR, R.L.; MARKHAM, P.N.; GEBEL, H.M.;
VOGLER, W.R. and KUO, J.F. Human leukemia K562 cell mutant (K562/OA 200)
select for resistance to okadaic acid (pprotein phosphatase inhibitor) lacks protein
kinase C- ϵ , exhibits multidrug resistance phenotype, and expresses drug pump
Pglycoprotein. **J.Biol.Chem.**, v, 269, p. 12332-12338, 1994.